

Doktori disszertáció

**A GYÓGYSZER-METABOLIZÁLÓ KÉPESSÉGHEZ IGAZÍTOTT
PSZICHOFARMAKOTERÁPIA LEHETŐSÉGEI**

Tóth Katalin

Okleveles biomérnök

**Témavezető: Dr. Monostory Katalin (Ph.D.)
tudományos főmunkatárs**

**ELTE TTK, Biológia Doktori Iskola
Doktori Iskola vezető: Dr. Erdei Anna**

**Szerkezeti Biokémia Program
Programvezető: Dr. Kovács Mihály**



**MTA Természettudományi Kutatóközpont, Enzimológiai Intézet,
Metabolikus Gyógyszer-kölcsönhatások Kutatócsoport**

Budapest

2017.

Tartalomjegyzék

1	BEVEZETÉS	4
2	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
2.1	Gyógyszer-metabolizmus	6
2.2	CYP szupercsalád	7
2.2.1	A metabolikus különbségek okai.....	9
2.2.1.1	CYP1A2.....	11
2.2.1.2	CYP2C9/19.....	13
2.2.1.3	CYP2D6.....	15
2.2.1.4	CYP3A4/5	17
2.3	N-acetil transzferázok	18
2.4	Pszichiátriai és neurológiai kórképek	19
2.5	A leggyakoribb mentális rendellenességek és az epilepszia kezelése.....	21
2.6	Leggyakrabban alkalmazott gyógyszerek	23
2.6.1	Klonazepam	23
2.6.2	Klozapin.....	24
2.6.3	Valproát	25
3	CÉLKITŰZÉSEK	27
4	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	28
4.1	A felhasznált anyagok.....	28
4.2	<i>In vitro</i> CYP enzimtéreképezés.....	28
4.3	Humán minták	29
4.4	CYPtest™	32
4.5	Fehérvérsejt izolálás.....	32
4.5.1	DNS izolálás.....	33
4.5.2	RNS izolálás.....	33
4.6	Reverz transzkripció.....	33
4.7	Polimeráz láncreakció	33
4.7.1	Genotipizálás	34
4.7.2	CYP expresszió meghatározása	35
4.8	Vérszint meghatározások.....	36
4.9	Statisztikai értékelések.....	36
5	EREDMÉNYEK	39

5.1	A klonazepam és a klozapin metabolizmusában résztvevő CYP enzimek azonosítása.....	39
5.2	<i>In vivo</i> vizsgálatok	40
5.2.1	Klonazepam.....	41
5.2.2	Klozapin	45
5.2.3	Valproát.....	52
5.2.4	A terápiás vérszint kialakulásához szükséges dózisok becslése	54
5.2.4.1	Pszichiátriai betegeknél alkalmazott klonazepam és klozapin dózisának becslése.....	54
5.2.4.2	Epilepsziás gyerekeknél alkalmazott valproát dózis becslése	58
5.2.5	Valproát kezelés CYP2C9-status alapján	59
6	DISZKUSSZIÓ	64
6.1	Személyre szabott klonazepam kezelés lehetősége	65
6.2	A klozapin kezelés személyre szabásának lehetőségei	66
6.3	CYP2C9-status alapú valproát terápia klinikai jelentősége	69
6.4	Következtetések	71
7	EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA.....	73
7.1	Tézispontok.....	73
8	ABSZTRAKT	75
9	ABSTRACT.....	77
10	KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	78
11	IRODALOMJEGYZÉK.....	79
12	FÜGGELÉK.....	91

RÖVIDÍTÉS JEGYZÉK

AhR Aromás szénhidrogén receptor

ALP Alkalikus foszfatáz

CAR Konstitutív Androsztán receptor

CYP Citokróm P450

GAPDH Glicerinaldehid 3-foszfát dehidrogenáz

GGT Gamma-glutamil transzferáz

GOT Glutamát-oxálacetát transzamináz

GPT Glutamát-piruvát transzamináz

HNF4 α Hepatocita nukleáris faktor 4 alfa

HPLC-MS/MS Folyadékkromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrometria

NAT2 N-acetil transzferáz 2

PXR Pregnán X Receptor

RXR Retinoid X Receptor

SNP Egy pontos polimorfizmus

1 BEVEZETÉS

A kutatómunka során a gyógyszeres antiepileptikus és antipszichotikus kezelés káros mellékhatásainak megelőzési lehetőségeit, valamint az egyes hatóanyagok terápiás koncentrációjához szükséges optimális dózis beállításának módját vizsgáltuk. Hatékony gyógyszeres kezelés beállítása pszichiátriai betegek esetében különösen nehézkes. Egyrészt az objektív diagnosztikai eszközök hiánya miatt, másrészt egy adott gyógyszer hatásosságának megítéléséhez gyakran hetek szükségesek. Magyarországon gyakorlatilag nincs lehetőség az antipszichotikumok vérszintjének monitorozására, holott nemzetközi ajánlások javasolják a terápiás gyógyszer szint monitorozás pszichiátriai alkalmazását.

A gyógyszeres terápia során jelentkező nem-kívánt mellékhatások egy része a gyógyszer-metabolizmus eltéréseiből, vagy megváltozásából fakad. A nem-kívánt mellékhatások károsíthatják az addig egészséges máj (és egyéb szervek) működését, vagy ronthatják a beteg életminőségét (pl.: elhízás, mozgás nehezítettség, fájdalmas izommerevség, álmoság, szédülés). A máj gyógyszer-metabolizáló képességét elsősorban a citokróm P450 (CYP) enzimek mennyisége és aktivitása határozza meg, amely nagyban befolyásolhatja egy adott gyógyszer hatékonyságát és esetleges toxicitását. A sejtekben lévő aktuális CYP enzimszint genetikailag meghatározott, amelyet külső és belső tényezők módosíthatnak. A betegek gyógyszerlebontó képessége, illetve CYP-statusa becsülhető a CYPtestTM diagnosztikai vizsgálattal, amely a gyógyszer-metabolizmusban résztvevő CYP enzimek aktuális expressziójának meghatározásán (CYP-fenotipizálás), és DNS analízissel megállapítható génhiba kimutatásán (CYP-genotipizálás) alapul. A CYP geno- és fenotipizálás módszereit együttesen alkalmazva meghatároztuk azon csökkent működőképességű, vagy működésképtelen enzimet eredményező CYP polimorfizmus(ok)at, amely a gyógyszerhatás elmaradásához és súlyos mellékhatások kialakulásához vezethet(nek). A CYP-status alapján következtethetünk az esetleges gyenge metabolizáló-képességre és javaslatot tehetünk a beteg gyógyszeres terápiájának egyénre szabott módosítására (egyes gyógyszerek dózisának csökkentésére vagy növelésére, esetleg visszavonására és helyettesítésére más alternatív hatóanyaggal). A személyre szabott terápiával várhatóan javítható a gyógyszerhatékonyság, csökkenthető a felesleges

gyógyszerfogyasztás és a mellékhatások kialakulásának kockázata, lerövidíthető a kórházi ellátás és gyorsabb gyógyulás érhető el.

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 Gyógyszer-metabolizmus

A farmakológiai hatás létrejöttéhez a gyógyszernek el kell jutnia a célszervhez a vérárammal, a szisztémás keringésből fel kell szívódnia a szövetekbe. A gyógyszerek szervezetből történő kiürülése pedig a gyógyszer-metabolizmus révén valósul meg. A metabolizmus során megváltozik a vegyületek kémiai szerkezete és fizikokémiai tulajdonságai, amely elősegíti a kiürülést. A metabolizmus során általában polárosabbá válnak és elveszítik farmakológiai hatásukat, de keletkezhetnek az anyavegyületnél hatékonyabb termékek (tamoxifen → endoxifen, morfin → morfin-6-glükuronid), vagy toxikus metabolitok is (paracetamol → *N*-acetyl-*p*-benzokinonimin). Egyes szerek, az ún. prodrug-ok, pedig teljesen hatástalanok addig, amíg a szervezet át nem alakítja őket (kodein → morfin, levodopa → dopamin).

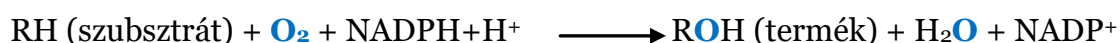
A testidegen anyagok átalakulásának folyamata két részre bontható („Fázis 1” és „Fázis 2” reakciók). Az elnevezést R. T. Williams javasolta 1959-es *Detoxication Mechanisms* című könyvében, annak megkülönböztetésére, hogy amíg a „Fázis 1” reakciók során inaktiválás és aktiválás egyaránt történhet, addig a „Fázis 2” folyamatokra – néhány kivételtől eltekintve – kifejezetten az inaktiválás jellemző. Az évek során azonban nem kevés kivételt fedeztek fel, de a terminológia fennmaradt (David Josephy *et al.* 2005). A „Fázis 1” átalakulásokra jellemző reakcióutak (oxidáció, redukció, hidrolízis) közül az oxidációs folyamatokban a CYP enzimeknek és a flavin monooxigenázoknak van a legnagyobb jelentősége, míg az alkohol- és aldehyd-dehidrogenázok valamint a monoamin-oxidázok kisebb szerepet töltenek be a gyógyszerek a „Fázis 1” reakcióiban. Az észterázok és epoxid hidrolázok hidrolitikus folyamatokat katalizálnak.

A „Fázis 2” folyamatok során akár az eredeti vegyületek, vagy azok „Fázis 1” metabolitjai különböző endogén molekulákkal konjugálódva hidrofilebb és általában kevésbé toxikus, illetve inaktív terméké alakulnak. A folyamat során leggyakrabban glükuronidáció, acetilezés, szulfatálás és glutathion konjugáció megy végbe, melyeket különböző transzferázok katalizálnak (UDP-glükuronil transzferáz, *N*-acetyl transzferázok, szulfotranszferázok és glutathion *S*-transzferázok) (Jancova *et al.* 2010).

A metabolizmus során polárossá vált, vagy töltéssel rendelkező metabolitok kiürülésében az aktív transzport kiemelkedő jelentőségű. A „Fázis 3” kifejezést 1992-ben Ishikawa javasolta – a korábbi terminológiát követve – a metabolitok eliminációjában részt vevő transzporterekre (David Josephy *et al.* 2005). Ezek a transzmembrán fehérjék az ATP-Binding Cassette (ABC) transzporterek népes családjába tartoznak, és szerkezetileg igen eltérő anyagok szállításáért felelősek a sejtmembránon keresztül (Doring és Petzinger 2014). A gyógyszerek kiürülésében a vese és az epe játssza a vezető szerepet, de a tüdő szerepe sem elhanyagolható.

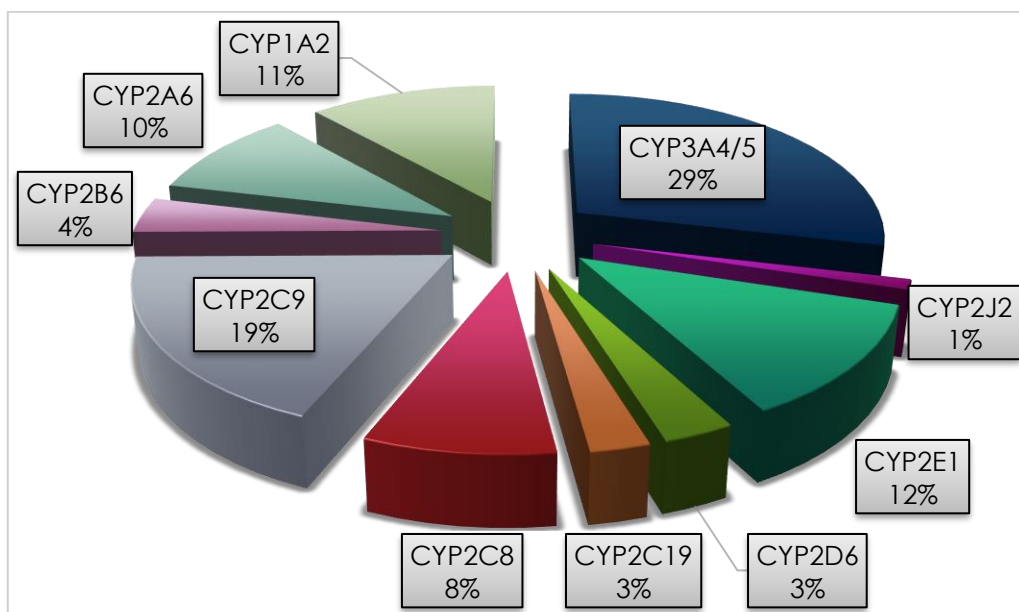
2.2 CYP szupercsalád

Az oxidációs folyamatok szempontjából az egyik legfontosabb enzimcsalád a CYP szupercsalád, tagjai olyan monooxygenázok, melyek egyrészt a szervezet saját anyagainak bioszintézisében és metabolizmusában, másrészt a szervezetbe kerülő testidegen anyagok (xenobiotikumok) lebontásában vesznek részt. A humán CYP szupercsaládot 57 gén és 58 pszeudogén alkotja. Aminosav-sorrend hasonlóságuk alapján 18 családot, ezen belül 44 alcsaládot alkotnak (<http://drnelson.uthsc.edu/human.P450.table.html>). Nemzetközileg elfogadott megállapodás szerint 40 %-os aminosav-sorrend egyezés esetén azonos családokba, 55 %-os hasonlóság alapján pedig azonos alcshaládokba sorolják az egyes CYP enzimeket (Nelson *et al.* 1996). A gyógyszer-metabolizmusban elsődleges szerepet a CYP1, CYP2 és CYP3 családba tartozó enzimek töltenek be, míg a többi család inkább endogén folyamatok katalízisében vesz részt, például szteroid hormonok, epesavak, koleszterin bioszintézise (Nebert és Russell 2002). Változatos reakciókat katalizálnak (hidroxilezés, N-, O-dealkilezés, N-oxid, szulfoxid képzés, epoxid képzés, redukció), működésük során a molekuláris oxigénből származó egyik oxigénatomot építik be a szubsztrátba, míg a másik vízkilépéssel távozik. A folyamat során az elektrontranszportot a NADPH-citokróm P450 reduktáz vagy a citokróm b₅ biztosítja (Peterson és Prough 1986). A folyamat bruttó egyenlete:

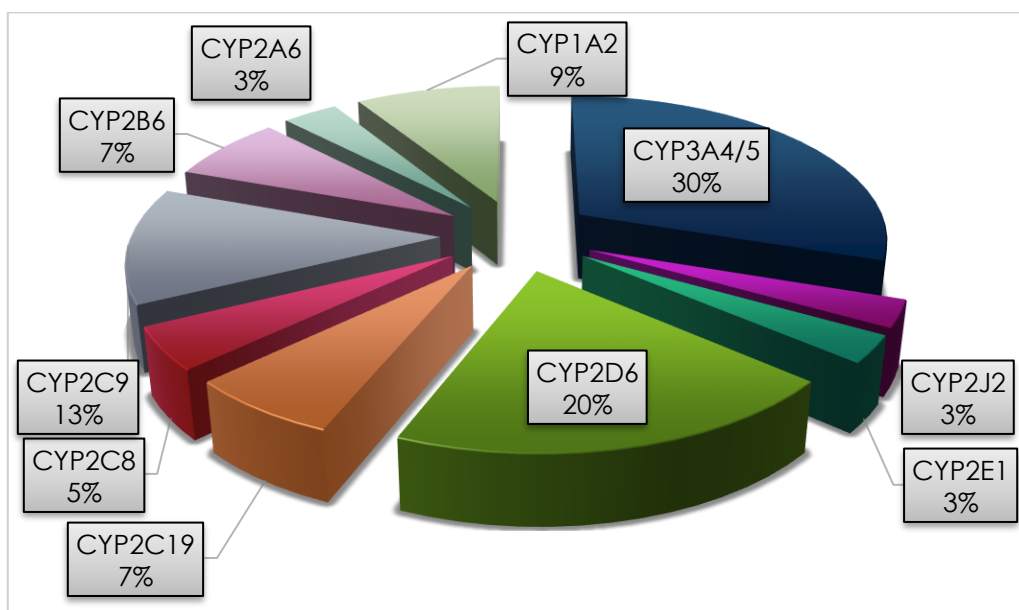


A CYP enzimek széles és átfedő szubsztrát-specifitása ellenére sok gyógyszer klinikailag releváns koncentrációban csak egy vagy néhány enzimen keresztül

metabolizálódik. Legnagyobb mennyiségben a máj hepatocitáinak endoplazmatikus retikulumában expresszálódnak, de kisebb koncentrációban megtalálhatóak a vékonybél enterocitáiban, a vesében, a tüdőben és az agyban egyaránt. A gyógyszer-metabolizmus szempontjából legfontosabb CYP enzimek mennyisége a májban (1. ábra), és a gyógyszer-metabolizmusban betöltött szerepe eltérő (2. ábra).



1. ÁBRA: A GYÓGYSZER-METABOLIZÁLÓ CYP ENZIMEK RELATÍV MENNYISÉGE A MÁJBAN (ZANGER ÉS SCHWAB 2013)



2. ÁBRA: A CYP ENZIMEK GYÓGYSZER-METABOLIZMUSBAN BETÖLTÖTT SZEREPE (ZANGER ÉS SCHWAB 2013)

2.2.1 A metabolikus különbségek okai

A metabolizmusban mutatkozó egyedi különbségeket egyrészt az egyes enzimek genetikai polimorfizmusa, másrészt az enzimek indukciója vagy gátlása egyaránt okozhatja. Egy gyógyszermolekula sorsát nagyban befolyásolhatja a CYP enzimek megnövekedett vagy csökkent mennyisége és katalitikus aktivitása, amely egyfelől a CYP gének polimorfizmusára (egy pontos nukleotid polimorfizmusok (SNP-k), illetve teljes gén deléciója vagy többszöröződése) vezethető vissza. Ugyanakkor mutációk hiányában egyéb faktorok (kor, nem, hormonális állapot, betegségek, alkohol és gyógyszer-fogyasztás) is befolyásolhatják a máj gyógyszer-lebontó aktivitását, átmeneti gyenge vagy extenzív metabolizáló képességet okozva. Erre a jelenségre vezette be Shah és Smith (2015) a fenokonverzió fogalmát.

A CYP enzimek indukciója xenobiotikumok hatására is bekövetkezhet. Az enzimindukció lehet valódi (*de novo* mRNS és fehérje szintézis történik) illetve látszólagos (mRNS élettartam növekedés vagy fehérje-degradáció gátlás révén) (Tompkins és Wallace 2007). A CYP gének szabályozásában nagy szerepe van a nukleáris receptoroknak. Ezek a ligand-aktivált transzkripciós faktorok a CYP gén promoter régiójának ismétlődő szekvenciáihoz (5'-AGGTCA-3') homo- vagy heterodimerként kötődve indukálják a CYP gén transzkripciót. A szekvenciákat általában 1-7 nukleotid választja el és orientációjukat tekintve lehetnek egyirányú ismétlődő (DRn), kifelé- (ERn) vagy befelé fordított (IRn) irányúak, ahol az n a „spacer” nukleotidok számát jelenti (Honkakoski és Negishi 2000). A nukleáris receptorok, illetve a transzkripciós faktorok nélkülözhetetlenek a génszabályozásban, ugyanakkor nem rendelkeznek kromatin szerkezet moduláló enzimaktivitással. Ezt a szerepet koreceptorok töltik be, melyek például ligand kötődés hatására gyűlnek a nukleáris receptorok köré. A koaktivátorok transzkripció fokozó hatással rendelkeznek, míg a korepresszoroknak transzkripció gátló hatásuk van (Gronemeyer *et al.* 2004).

1. TÁBLÁZAT: A CYP GÉNEK SZABÁLYOZÁSÁBAN RÉSZTVEVŐ LEGFONTOSABB NUKLEÁRIS RECEPTOROK
(CZEKAJ ÉS SKOWRONEK 2012)

Receptor	Szabályozott CYP gén	Induktor
AhR	CYP1A2	3-metilkolantrén
CAR	CYP2C9/19, CYP3A4/5	fenobarbitál
GR	CYP2C9/19, CYP3A4/5	dexametazon
PXR	CYP2C9/19, CYP3A4/5	rifampicin
VDR	CYP2C9, CYP3A4	paricalcitol
HNF4α*	CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4/5	-

(*A HNF4α nukleáris receptor főként a májban expresszálódik, de a xenoreceptorokkal (CAR, GR, PXR) ellentétben xenobiotikumokkal nem indukálható, általános szerepe van az alaptranszkripció szabályozásában számos CYP gén esetén (Gonzalez 2008).)

A nukleáris receptorokat endogén ligandjaik (hormonok, citokinek) mellett számos xenobiotikum is képes közvetlenül, vagy szignál transzdukció útján aktiválni, ezáltal a transzkripciót fokozva, emelni a sejtben a CYP enzim mennyiségét (1. táblázat). Így az enzimindukció egyrészt számos gyógyszer-interakció forrása is lehet, hiszen az érintett vegyület metabolizmusának fokozódása, a terápiás hatás elmaradásához is vezethet, másrészt a nukleáris receptorok aktiválása egyéb biokémiai folyamatokra is hatással lehet. Az enzimindukció általában lassan alakul ki, viszont hatása az induktor molekula eltávoztása után is fennmarad.

A gyógyszer-interakciók egy másik része pedig a CYP enzimek működésének gátlására vezethető vissza. Az enzimek működése reverzibilisen és irreverzibilisen is gátolható. Az inhibíció lehet kompetitív, nem kompetitív, unkompetitív és mechanizmus alapú.

Kompetitív reverzibilis gátlás esetén mind a gátló molekula, mind a szubsztrát verseng az enzim aktív helyéért. Adott szubsztrát koncentrációnál a kompetitív inhibitor csökkenti az enzim-szubsztrát komplex kialakulásának esélyét, azonban kellően magas szubsztrát koncentrációnál az inhibitor hatása elhanyagolható. Klinikailag jelentős kompetitív CYP3A inhibitorok pl. az antifungális azolok (ketokonazol, flukonazol). Nem kompetitív reverzibilis gátlásnál az inhibitor nem az enzim aktív helyéhez, hanem egy másik, allosztérikus kötőhelyhez kötődik, megváltoztatva így az enzim konformációját, melyhez a szubsztrát már nem tud kötődni. A gátló hatást csak az inhibitor eltávolításával lehet megszüntetni. Nem

kompetitív CYP2D6 inhibitor pl. a hiperforin. Unkompetitív reverzibilis gátlásnál a gátlószer csak az enzim-szubsztrát komplexhez kötődik, a szabad enzimhez nem. A gátló hatás itt sem függeszthető fel a szubsztrát-koncentráció emelésével.

A CYP enzimek esetében meg kell említeni a mechanizmus-alapú gátlást is, mely során a gátlószer először enzimatikusan átalakul, majd a metabolit fejti ki a gátló hatást. Ez a típusú gátlás irreverzibilis, a képződött metabolit tovább foglalja el az aktív helyet, mint egy átlagos szubsztrát, szélsőséges esetben azonban teljesen tönkre is teheti az enzimet. Ilyen mechanizmus alapú gátlószerek pl. az eritromicin, a ritonavir, a fluoxetin és a grapefruit lé furano-kumarin komponense is (Coleman 2010).

2.2.1.1 CYP1A2

A humán *CYP1A2* gén a 15-ös kromoszómán (15q24.1) helyezkedik el, 7 exon-ból és 6 intron-ból áll, molekulatömege 58,3 kDa (Zhou *et al.* 2010). A CYP1A2 egyike a legjelentősebb gyógyszer-metabolizáló enzimeknek, a forgalomban levő gyógyszerek ~10 %-ának a lebontásáért felel (2. ábra), amelybe fájdalomcsillapítók (acetaminofen, fenacetin), egyes pszichofarmakonok (duloxetine, olanzapin), és kardiovaszkuláris szerek (pl.: propranolol) egyaránt tartoznak. Endogén szubsztrátjai közé tartozik az arachidonsav, a prosztaglandinok, ösztrogének és a melatonin (Nebert és Dalton 2006). Ugyanakkor prokarcinogén vegyületek (benzpirén, arilaminok) aktivációjában és karcinogén anyagok inaktiválásában is szerepet játszik. Az enzim kötőzsebébe illeszkedő xenobiotikumok reverzibilisen vagy irreverzibilisen gátolhatják (α -naftoflavon) az enzim működését. A CYP1A2 alapvetően a májban expresszálódik. A CYP1A alcsaládba tartozó *CYP1A1* és *CYP1A2* gének orientációja 'fej-fej' irányultságú, és egy közös, ~23kb hosszúságú kétirányú promoter régiójuk van, mely számos szabályozó szakaszt (XRE) tartalmaz. Néhányuk mindkét irányban működik, tehát mind a *CYP1A1* mind a *CYP1A2* transzkripcióját képes fokozni (Ueda *et al.* 2006). A CYP1A génexpresszió szabályozása az aromás szénhidrogén receptoron (AhR) keresztül valósul meg. A CYP1A2-t számos xenobiotikum indukálhatja, mint az AhR ligand 3-metilcolantrén és egyéb policiklusos aromás szénhidrogének, a dohányfüst egyes komponensei, valamint atipikus induktorok (omeprazol), melyek ugyanazon szabályozó elemeken keresztül hatnak, de AhR kötődés nélkül (Yoshinari *et al.*

2008). Yoshinari *et al.* (2010) a *CYP1A1* és a *CYP1A2* együttes transzaktivációját figyelte meg a konstitutív androsztán receptoron (CAR-on) keresztül, mely egy közös, cisz-szabályozó elemhez (ER8) kapcsolódik. Ugyanakkor a *CYP1A2* gén pregnán X receptoron (PXR-on) keresztül történő szabályozása elhanyagolható.

Mivel a *CYP1A2*-nek a prokarcinogén (policiklusos aromás szénhidrogének, heterociklusos aromás aminok) bioaktivációban esszenciális szerepe van, felmerült, hogy az enzim emelkedett szintje összefüggésben lehet egyes daganatos megbetegedések kialakulásának fokozott kockázatával (Landi *et al.* 2005). Vukovic *et al.* (2016) meta-analízise ugyanakkor nem talált kapcsolatot az eltérő *CYP1A2* expressziót okozó genetikai polimorfizmusok és különböző típusú daganatok kialakulásának kockázata között.

A *CYP1A2* gén nagyfokú variabilitása csak korlátozott hatással van a gyógyszer-metabolizmusra. Egy, a promoter régióban levő polimorfizmus (*CYP1A2*1C*) esetén csökkent enzimaktivitást figyeltek meg a koffein metabolizmusban japán dohányosok esetében (Nakajima *et al.* 1999), ugyanakkor Ghotbi *et al.* (2007) nem talált összefüggést a -3860G>A polimorfizmus (*CYP1A2*1C* allél) és a *CYP1A2* aktivitás között sem a koreai, sem a svéd populációban. Az 1-es intron-ban bekövetkező változás (*CYP1A2*1F*) a leggyakrabban előforduló polimorfizmus. Allélfrekvenciája hasonló az afrikai (0,6)(Aklillu *et al.* 2003), ázsiai (0,63) (Ghotbi *et al.* 2007) és fehér (0,68) (Sachse *et al.* 1999) populációban egyaránt. A -163C>A polimorfizmus (*CYP1A2*1F*) fokozott indukálhatósághoz vezetett német (Sachse *et al.* 1999) és svéd dohányosok esetében, koreaiaknál viszont nem volt hatása az aktivitásra (Ghotbi *et al.* 2007). Aklillu *et al.* (2003) a *CYP1A2* genetikai polimorfizmusának hatását vizsgálva az afrikai populációban, szintén nem talált jelentős különbséget az enzimaktivitások és a -163C>A polimorfizmus között. Ugyanakkor Ghotbi *et al.* (2007) megjegyzi, hogy a citozin > adenin cserének abban az esetben van hatása a *CYP1A2* aktivitásra, amennyiben nem kapcsolódik egyéb polimorfizmushoz. A *CYP1A2*1K* haplotípust Aklillu *et al.* (2003) írta le először, csökkent enzimaktivitást észlelve etiópiai nem-dohányzóknál, de meglehetősen alacsony előfordulási gyakorisága miatt, a gyógyszer-metabolizmusban betöltött szerepe megerősítésre szorul. A *CYP1A2*7* az egyetlen olyan *CYP1A2* mutáció, mely splicing hiba miatt vezet működésképtelen enzim keletkezéséhez (Allorge *et al.* 2003). Leírása óta viszont nem fordult elő újabb eset az irodalomban. Az eddig

azonosított SNP-k és haplotípusok csak részben magyarázzák a CYP1A2 expressziójában és aktivitásában mutatkozó inter-individuális különbségeket, így a fenotípus nem becsülhető jól a genotípusból (Jiang *et al.* 2006; Adehin *et al.* 2017).

2. TÁBLÁZAT: A CYP1A2 LEGGYAKORIBB POLIMORFIZMUSAI A KAUKÁZUSI POPULÁCIÓBAN

Allél	SNP	Fehérje hatás	Enzimaktivitás	Allél-gyakoriság [¥]
CYP1A2*1C (rs2069514)	-3860G>A	Promoter	csökkent	0,01-0,08
CYP1A2*1F (rs762551)	-163C>A	Promoter	fokozott indukálhatóság	0,5-0,8
CYP1A2*1K (rs12720461)	-729C>T, -739T>G, -163C>A	Promoter	csökkent	0,03-0,05 [#]
CYP1A2*7 (rs56107638)	3533G>A	splicing defect	nincs	

[#](Aklillu *et al.* 2003), [¥](Zanger és Schwab 2013)

2.2.1.2 CYP2C9/19

A CYP2C9 gén a 10-es kromoszómán (10q23.33) közvetlenül a CYP2C19 után helyezkedik el, a 490 aminosavból álló fehérjét 9 exon kódolja. A CYP2C gének promoter régiója számos szabályozó elemet tartalmaz, amelyekhez kötődhet az aktivált glükokortikoid receptor (GR), a PXR és CAR (Jover *et al.* 2009). A CYP2C9 transzkripcióját elsődlegesen a GR szabályozza, a maximális indukció kialakulásához ugyanakkor a nukleáris receptorok együttműködése szükséges (Jover *et al.* 2009). A CYP2C9 és CYP2C19 alapvetően a májban expresszálódik, a CYP2C9 a máj CYP tartalmának közel 20 %-át teszi ki, míg a CYP2C19 1-2%-ban expresszálódik (1. ábra). A CYP2C9 kisebb mennyiségben extrahepatikus szövetekben is megtalálható, a vékonybélben a CYP3A4 után a második legnagyobb mennyiségben jelenlévő enzim (Paine *et al.* 2006). A gyógyszerek ~20 %-a CYP2C9 szubsztrát: többek között az antikoaguláns warfarin, az entiepileptikus hatású valproát és fenitoin, az anti-diabetikus hatású tolbutamid és a legtöbb nemszteroid gyulladáscsökkentő. Endogén ligandjai az arachidonsav és néhány

szteroid. Rifampicinnel, dexametazonnal és fenobarbitállal indukálható, szelektív gátlószere a szulfafenazol. Warfarinnal és ligand nélkül is kristályosított szerkezete egyrészt új kötőzsebet tárt fel, valamint arra enged következtetni, hogy egyszerre több szubsztrát megkötésére is képes (Williams *et al.* 2003).

A CYP2C9 enzimet kódoló gén rendkívül polimorf, eddig 60 allélváltozatát azonosították már, legtöbbje csökkent enzimaktivitást okoz. A fehér populációban két leggyakrabban előforduló polimorfizmusa a CYP2C9*2 és a CYP2C9*3. A CYP2C9*2 variánsban bekövetkező arginin > cisztein aminosav-csere csökkent affinitást eredményez a NADPH-citokróm P450 reduktázhoz, de a szubsztrát kötődést nem befolyásolja. A vad típushoz (CYP2C9*1) képest a CYP2C9*2 homozigóta mutánsokban csökkent a metabolizmus sebessége, míg a CYP2C9*3 allél izoleucin > leucin cseréje sokkal drasztikusabb aktivitás-vesztéssel jár a legtöbb szubsztrátnál (Lee *et al.* 2002).

3. TÁBLÁZAT: A CYP2C9 LEGGYAKORIBB POLIMORFIZMUSAI A KAUKÁZUSI (FEHÉR) POPULÁCIÓBAN

Allél	SNP	Fehérje hatás	Enzimaktivitás	Allél-gyakoriság [¥]
CYP2C9*2 (rs1799853)	3608C>T	R144C	csökkent NADPH-citokróm P450 reduktáz affinitás	0,08-0,13
CYP2C9*3 (rs1057910)	42614A>C	I359L	csökkent	0,07-0,09

[¥] (Zhou *et al.* 2010)

A CYP2C19 enzimnek kiemelkedő szerepe van a protonpumpa inhibitor omeprazol és pantoprazol, és egyes antidepresszánsok (klomipramin, citalopram) metabolizmusában, valamint a trombocita-aggregációt gátló klopidoogrel metabolikus aktivációjában. Endogén szubsztrátja a progeszteron és a melatonin. A CYP2C9 indukciót okozó rifampicin, dexametazon és fenobarbitál a CYP2C19 indukciójában is részt vesz. Tipikus próba-szubsztrátja a mefenitoin, tiklopidinnel pedig szelektíven gátolható a CYP2C19 működése.

A CYP2C19 gén 35 allélváriánsa közül gyakoriak az inaktív enzimet, vagy teljes enzimhiányt eredményező defektusok. A két leggyakoribb null allél közül a CYP2C19*2 a fehér populációra jellemző, és hibás splicing miatt okoz inaktív

enzimet. A *CYP2C19**3 pedig az ázsiai populációban fordul elő gyakrabban és korai stop kodon által csonka, működésképtelen enzim termelődéséhez vezet. A *CYP2C19**4 allélban az ATG start kodon GTG-re változva enzimhiányt okoz (Desta *et al.* 2002). Eltérően az előbbiektől a promoter régió -806C>T (*CYP2C19**17) polimorfizmusa fokozott transzkripcióhoz vezet, mely a *CYP2C19* szubsztrátok gyorsabb metabolizmusát eredményezheti (Strom *et al.* 2012).

4. TÁBLÁZAT: A *CYP2C19* LEGGYAKORIBB POLIMORFIZMUSAI A KAUKÁZUSI POPULÁCIÓBAN

Allél	SNP	Fehérje hatás	Enzimaktivitás	Allél-gyakoriság [¥]
<i>CYP2C19</i> *2 (rs4244285)	19154G>A	splicing defekt	nincs	0,075-0,273
<i>CYP2C19</i> *3 (rs4986893)	17948G>A	stop kodon	nincs	0-0,068
<i>CYP2C19</i> *4 (rs28399504)	1A>G	GTG start kodon	nincs	0-0,013
<i>CYP2C19</i> *17 (rs12248560)	-806C>T		fokozott	0,113-0,329

[¥] <https://www.pharmgkb.org/page/cyp2c19RefMaterials>

2.2.1.3 CYP2D6

A *CYP2D6* gén a 22-es kromoszómán (22q13.1) helyezkedik el, a 497 aminosavból álló fehérjét 10 exon kódolja. Szabályozásában nukleáris receptorok nem vesznek részt, tipikus CYP induktorokkal (rifampicin, fenobarbitál, dexametazon) nem indukálható (Zhou *et al.* 2009).

A máj CYP enzim tartalmának csak mintegy 4 %-át teszi ki, de a gyógyszer-metabolizmusban betöltött szerepe annál nagyobb, a gyógyszerek több mint 20 %-át bontja (1. ábra és 2. ábra). Szubsztrátjai között a köhögéscsillapító dextrometorfán, antidepresszánsok és antipszichotikumok (paroxetin, venlafaxin, aripiprazol, risperidon), β -blokkolók (metoprolol, propranolol) és ópioid fájdalomcsillapítók (tramadol, kodein) egyaránt megtalálhatóak, a nem *CYP2D6* szubsztrát quinidinnel pedig szelektíven gátolható (Zanger *et al.* 2004).

Az európai fehér populációban előforduló leggyakoribb polimorfizmus a *CYP2D6**4, splicing defekt miatt működésképtelen enzim termelődéséhez vezet. A *CYP2D6**5 esetén a teljes gén deléciója figyelhető meg, míg másik két null allél, a *CYP2D6**3 és *CYP2D6**6 egy-egy nukleotid deléciója a leolvasási keret eltolódását okozza. A *CYP2D6**3 és *CYP2D6**6 előfordulási gyakorisága 1 % körüli a fehér populációban. Csökkent enzimaktivitással jár a *CYP2D6**10 és a *CYP2D6**41 allél jelenléte. A *CYP2D6**10 allél citozin > timin cseréje miatt instabil fehérje keletkezik, allélgyakorisága 2 % körüli a fehér populációban (Griese *et al.* 1998). A *CYP2D6**41 allél egy, a 6-os intronban bekövetkező SNP-t jelöl, mely során téves kivágódás miatt kevés működőképes enzim termelődik (Toscano *et al.* 2006). A *CYP2D6* teljes deléciója mellett a gén többszöröződése is előfordulhat, mely fokozott expresszióhoz vezet; fokozott *CYP2D6* aktivitással azonban csak akkor jár, ha a gén sokszorozódás működőképes enzimet termelő allélnál következik be (Sachse *et al.* 1997).

5. TÁBLÁZAT: A *CYP2D6* LEGGYAKORIBB POLIMORFIZMUSAI A KAUKÁZUSI POPULÁCIÓBAN

Allél	SNP	Fehérje hatás	Enzimaktivitás	Allél-gyakoriság [¥]
<i>CYP2D6</i> *3 (rs35742686)	2549delA	frameshift	nincs	~0,01
<i>CYP2D6</i> *4 (rs3892097)	1846G>A	splicing defekt	nincs	0,15-0,25
<i>CYP2D6</i> *5		gén deléció	nincs	0,03-0,06
<i>CYP2D6</i> *6 (rs5030655)	1707delT	frameshift	nincs	~0,01
<i>CYP2D6</i> *10 (rs1065852)	100C>T	P34S	csökkent	0,02
<i>CYP2D6</i> *41 (rs28371725)	2988G>A	splicing defekt	csökkent	0,09
<i>CYP2D6</i> duplikáció		kópiaszám változás	fokozott	0,01-0,09

[¥] (Zanger és Schwab 2013)

Mivel a *CYP2D6* egy konstitutívan expresszálandó enzim, így a fenotípusában mutakozó óriási inter-individuális különbségek háttérében a több, mint 100

allélváltozata áll, melyek többnyire teljes enzimhiányt, csökkent aktivitást okoznak, de fokozott expressziót eredményező variánsok is megtalálhatók. A genotípus alapján 4 metabolizáló csoportba osztható a populáció. Két működésképtelen allélt hordozó betegeknél gyenge CYP2D6 metabolizmusra lehet számítani, egy működőképes allél esetén intermediér metabolizáló fenotípusba sorolható a beteg, két működőképes allél extenzív, míg működő allélok többszöröződése ultragyors fenotípust jelent (Zanger és Schwab 2013).

2.2.1.4 CYP3A4/5

A CYP3A4 és a CYP3A5 enzimet kódoló gének a 7-es kromoszómán (7q22.1) helyezkednek el, szekvenciájuk >85 % hasonlóságot mutat. A májban és a vékonybélben egyaránt legnagyobb mennyiségben expresszáldó enzim a CYP3A4, míg a vesében, a tüdőben és az agyban a CYP3A5 kifejeződése jelentős (Daly 2006). A CYP3A enzimek töltik be a legnagyobb szerepet a gyógyszer-metabolizmusban (> 30 %)(2. ábra), a nagy és rugalmas kötőzsebüknek köszönhetően szubsztrát-spektrumuk széles és átfedő. Tipikus nagy molekulatömegű szubsztrátjai az immunszuppresszáns ciklosporin, és a takrolimus, valamint a makrolid antibiotikum eritromicin. De kisebb molekulákat, mint a koleszterin-szint csökkentő sztatinok (atorvasztatin), pszichofarmakonok (midazolam, klonazepam, klopabin), és a vérnyomáscsökkentő nifedipin, szintén metabolizálnak. Ketokonazzal a CYP3A aktivitás szelektíven gátolható. Endogén induktoraik (glükokortikoidok, epesavak) mellett számos xenobiotikum (rifampicin, fenobarbitál, dexametazon) is képes a transzkripciójuk fokozására. A CYP3A4 alap-expressziójának szabályozásában pozitív és negatív regulátorok egyaránt részt vesznek (Jover *et al.* 2009). A CYP3A gének indukciója komplex folyamat, elsődlegesen PXR szabályozása alatt állnak. Ezen túl az aktiválódott CAR/RXR heterodimer, valamint GR/GR homodimer és VDR/RXR komplex is képes a transzkripció fokozására (Timsit és Negishi 2007; Pascussi *et al.* 2008).

A CYP3A4 aktivitásában jelentős, akár 100-szoros eltérés is mutatkozhat az egyének között, melyek csak részben vezethetők vissza genetikai okokra (Temesvári *et al.* 2012). A promotor régióban megjelenő mutáció (CYP3A4*1B) fokozott transzkripcióhoz vezet, ugyanakkor klinikai jelentősége kétséges (Garcia-Martin *et al.* 2002; Amirimani *et al.* 2003). A CYP3A4*22 allél viszont csökkent

mRNS expressziót, ezáltal csökkent enzimaktivitást okoz (Okubo *et al.* 2013). A *CYP3A4*1B* a *CYP3A5* expressziót okozó *CYP3A5*1* alléllal kapcsoltan (linkage disequilibrium) jelenik meg (Semiz *et al.* 2011; Wang *et al.* 2011).

A *CYP3A5* enzim az európai populáció ~90 %-ában nem fejeződik ki, ugyanis a *CYP3A5*3* allél jelenléte „splicing defect” miatt korai stop kodont eredményez, ezáltal nem keletkezik működő *CYP3A5* enzim. Azon egyéneknél, akik legalább heterozigóta formában hordozzák a *CYP3A5*1* vad típusú allélt, tehát *CYP3A5* expresszálók, néhány *CYP3A* szubsztrát (pl.: takrolimusz) fokozottabb metabolizmusa figyelhető meg (Monostory *et al.* 2015).

6. TÁBLÁZAT: A *CYP3A4* ÉS *CYP3A5* GÉNEK LEGGYAKORIBB POLIMORFIZMUSAI A KAUKÁZUSI POPULÁCIÓBAN

Allél	SNP	Fehérje hatás	Enzimaktivitás	Allél-gyakoriság [¥]
<i>CYP3A4*1B</i> (rs2740574)	-392A>G	Promoter	fokozott?	0,03-0,05
<i>CYP3A4*22</i> (rs35599367)	15389C>T	intron6	csökkent	0,025-0,08
<i>CYP3A5*3</i> (rs776746)	6986A>G	splicing defect	nincs	0,88-0,97

[¥] (Zanger és Schwab 2013)

2.3 N-acetil transzferázok

Az N-acetil transzferázok (NAT) citoszolikus enzimek, N-acetil-konjugációt katalizálnak. Emberben a két izoformáját (NAT1 és a NAT2) kódoló gének a 8-as kromoszómán (8p22) egymás mellett helyezkednek el (Hickman *et al.* 1994). A NAT1 megtalálható minden szövetben, a NAT2 viszont elsősorban a májban és a vékonybélben expresszálódik. Aril-amin és hidrazin csoportok acetilezését katalizálják, acetil donorként acetil-CoA-t használnak. Szubsztrátspecifitásuk különbözik, de vannak átfedések. NAT1 szubsztrát például a *p*-aminobenzoészav és a *p*-aminoszalicilészav; az antiaritmiás prokainamid, a vérnyomáscsökkentő hidralazin és az antituberkulotikum izoniazid pedig kizárólag NAT2 szubsztrát, de mindkét enzim képes a 2-aminofluorén karcinogén aktiválására (Boukouvala és Sim 2005).

A *NAT2* genetikai polimorfizmusai miatt a keletkező enzimek aktivitása eltérő, a fehér populáció nagyjából 50-50%-ban osztható „gyors-” illetve „lassú-acetiláló” fenotípusúra (Grant *et al.* 1991). Az eltérő acetilezési sebesség hatással van a gyógyszeres kezelés hatékonyságára. „Gyors-acetiláló” típusnál hatástalannak bizonyulhat a tuberkulózis kezelése, míg a „lassú-acetiláció” fenotípus toxikus hatásokkal hozható összefüggésbe, mint az izoniazid indukálta hepatotoxicitás (Gupta *et al.* 2013). A „lassú-acetiláló” fenotípus hajlamosíthat bizonyos ráktípusokra, különös tekintettel a hólyagrákra (Hein *et al.* 2000). A „gyors-acetilálók” legalább egy vad típusú allélt (*NAT2**4), míg a „lassú-acetilálók” csak polimorf allélokat (7. táblázat) hordoznak.

7. TÁBLÁZAT: A FEHÉR POPULÁCIÓBAN ELŐFORDULÓ LEGGYAKORIBB *NAT2* POLIMORFIZMUSOK

Allél	SNP	Fehérje hatás	Fenotípus
<i>NAT2</i> *4		vad típus	gyors acetiláló
<i>NAT2</i> *5 (rs1801280)	341T>C	I114T	lassú acetiláló
<i>NAT2</i> *6 (rs1799930)	590G>A	R197Q	lassú acetiláló
<i>NAT2</i> *7 (rs1799931)	857G>A	G286E	lassú acetiláló
<i>NAT2</i> *14 (rs1801279)	191G>A	R64Q	lassú acetiláló

http://nat.mbg.duth.gr/Human%20NAT2%20alleles_2013.htm

2.4 Pszichiátriai és neurológiai kórképek

Egy 2010-es felmérés szerint az európai lakosság több mint harmada (38,2 %) szenved valamilyen mentális rendellenességtől vagy neurológiai betegségtől (Wittchen *et al.* 2011). A szkizofrénia, a depresszió, az epilepszia, a demencia és egyéb mentális vagy neurológiai betegségek a globális betegségteher 13 %-át alkotják (Collins *et al.* 2011).

A szkizofrénia az elmeműködés zavarának súlyos formája, melyet a különböző pszichés működések (gondolkodás, valóságérzékelés, magatartás) zavarai jellemeznek. A szkizofréniát kiváltó okok nem egyértelműek, kialakulásában

valószínűleg genetikai és környezeti tényezők egyaránt közrejátszanak. A megbetegedés a népesség ~1 %-át érinti világszerte (Ayano 2016). A jellegzetes tünetek alapvetően két csoportra oszthatók, a pozitív tünetekre, mint pl. érzéksalódások, téveszmék és negatív tünetekre, mint pl. az érzelmek és a kommunikáció elszegényedése. Ezeket egészítik ki a kognitív tünetek, melyet a gondolkodás alaki zavara, dezorganizált beszéd és magatartás jellemez. A szkizofrénia bármelyik fázisában előfordulhat depresszív tünettan is (Fekete *et al.* 2010).

A szkizoaffektív zavar akkor diagnosztizálható, ha a szkizofrénia és a hangulati zavar tünetei egyaránt megjelennek, egyformán kifejezettek a betegség ugyanazon epizódjában, és a tünetek külön-külön nem elegendőek a szkizofrénia vagy az affektív zavar diagnózisához. Élettartam prevalenciájára csak becslések vannak, egy finn tanulmány (Perala *et al.* 2007) 0,3 %-ot említ, egy francia összefoglaló cikk pedig 0,5-0,8 % közé teszi (Azorin *et al.* 2005).

Bipoláris affektív betegségre a különböző súlyosságú depressziós, mániás és kevert epizódok váltakozása jellemző, melyet hosszabb-rövidebb tünetmentes periódusok szakítanak meg. Míg a depressziós epizódot általános lehangoltság, csökkent gondolkodási és koncentrációs képesség, értéktelenség-érzés kíséri, a mániás epizódra legalább 1 hétig tartó, abnormálisan emelkedett vagy ingerlékeny hangulat jellemző. Kevert affektív epizód esetén az állapot egy időben meríti ki mind a mániás, mind a major depressziós epizód kritériumait (EMMI 2016). A pszichiátriában előforduló negyedik leggyakoribb kórkép, előfordulása a magyarországi felnőtt lakosság körében a világon legmagasabbak közé tartozik (5,1%)(Szádóczy E 2000).

Az epilepszia krónikus központi idegrendszeri kórállapot. Fő klinikai jellemzői a spontán fellépő és többnyire önmaguktól megszűnő, ismétlődő rohamszerű események, az epilepsziás rohamok. Alapját az idegsejtek kórosan fokozott ingerlékenysége, fokozott elektromos aktivitása képezi. Amennyiben a rohamot külső tényezők vagy a szervezet kórállapota provokálják (pl.: trauma, láz vagy akut idegrendszeri betegség), akkor alkalmi (provokált) rohamról beszélünk, melyet az epilepsziától el kell különíteni. Az epilepsziás rohamok nemzetközi klasszifikációja igen bonyolult és az új ismeretek birtokában rendre változik. A gyakorlat számára leegyszerűsítve kétféle típusba sorolhatjuk. A parciális rohamot az agykéreg valamely körülírt területének kóros aktivációja hozza létre, míg generalizált

rohamok kezdetét követően a roham mindkét agyféltekére kiterjed minden esetben eszméletlenséggel jár. Klasszikus formája a '*grand mal*' (EMMI 2017). Az epilepszia általános prevalenciája 1 % körüli az egész világon, gyermek és serdülőkorban, valamint időskorban mutat magasabb értéket (Shakirullah *et al.* 2014). Kialakulásában örökletes és szerzett faktorok, az agyat érintő károsító hatások egyaránt szerepet játszanak.

2.5 A leggyakoribb mentális rendellenességek és az epilepszia kezelése

A szkizofrénia és egyéb pszichózisok kezelésében áttörést először a klórpromazin 1952-es bevezetése, majd a haloperidol 1958-as felfedezése jelentett. Ezek az első szerek úgynevezett típusos vagy első generációs antipszichotikumok, erős D₂ receptor antagonisták. Hatásosnak bizonyultak a hallucinációk és agitáltság kezelésében, ugyanakkor heveny neurológiai (extrapiramidális) és endokrin (hiperprolaktinémia) tüneteket is okoztak (Gazdag *et al.* 2012). Az első generációs szerek bár hatékonyak a szkizofrénia pozitív tüneteinek kezelésében, hatástalanok a tartósan fennálló negatív tünetekkel szemben és nem előzik meg a kognitív hanyatlást sem. Az új korszak a klozapin alkalmazásával kezdődött az 1970-es években, melyet további, neurológiai mellékhatásokat kevésbé okozó antipszichotikumok felfedezése követett (quetiapin, risperidon, olanzapin, aripiprazol). Ezek a második generációs antipszichotikumok, már kevesebb extrapiramidális tünetet okoznak és valamivel hatékonyabbak a negatív és kognitív tünetek enyhítésében is. Szakmai ajánlások a második generációs antipszichotikumokat javasolják elsőként választandó szerként a szkizofrénia kezelésében. A szkizofrénia hosszú távú kimenetele változó, a betegek jelentős részére kedvező lehet. Terápiájának elsődleges célja a pozitív tünetek (hallucinációk, téveszmék) csökkentése, megszüntetése, illetve a relapszusok elkerülése. Ennek meghatározó és nélkülözhetetlen eleme az antipszichotikus gyógyszerelés (Kovács 2011).

A bipoláris zavarban szenvedő betegek döntő többsége gyógyszeres és pszichoterápiás módszerek kombinációjával jól kezelhető. A hosszú távú terápia lényegét a hangulatstabilizáló gyógyszerelés jelenti. A depressziós epizód esetén az antidepresszív monoterápia kontraindikált, egyes második generációs antipszichotikumoknak (quetiapin, olanzapin) van a legnagyobb jelentősége,

illetve hangulatstabilizálók antidepresszívummal (valproát + szelektív szerotoninviszavétel-gátló), vagy két hangulatstabilizáló szer (lítium + valproát) kombinálása is felmerül. Fontos, hogy antidepresszáns szereket csak hangulatstabilizálókkal kombinációban és mindig csak a depressziós tünetek fennállásáig szabad adni, máskülönben nagyra nő a mániába vagy kevert fázisba való gyors átváltás esélye. Mániás időszakban is indokolt hangulatstabilizáló szerek adása, hiszen a legtöbbnek (valproát, lítium, karbamazepin) akut, antimániás hatása is van, de az összes 2. generációs antipszichotikum és a benzodiazepin klonazepam is rendelkezik ilyen hatással (EMMI 2016).

Az epilepszia terápiája gyógyszeres, sebészi és egyéb elemekből áll. A kezelés alapvető célja a rohammentesség elérése és a jó életminőség biztosítása. Az epilepszia jól kezelhető, a megfelelő antiepileptikus kezeléssel a betegek 70-75%-a rohammentessé tehető, míg a gyógyszer-rezisztens betegek 30-40%-ánál a műtéti kezelés hatásos; tartós vagy átmeneti rohammentességet és jobb életminőséget eredményez. Antiepileptikus kezelésben először monoterápia ajánlott, mely mellett a legtöbb esetben rohammentesség érhető el, mellékhatás nélkül vagy a beteg által tolerálható mellékhatás(ok) mellett. A kezelést kis adaggal célszerű indítani, és fokozatosan emelni a tervezett dózisig. Hatástalanság esetén alternatív monoterápiával lehet folytatni, de az antiepileptikum cseréje, csökkentése vagy elhagyása is csak fokozatosan történhet a megvonásos rohamok kialakulásának veszélye miatt (EMMI 2017).

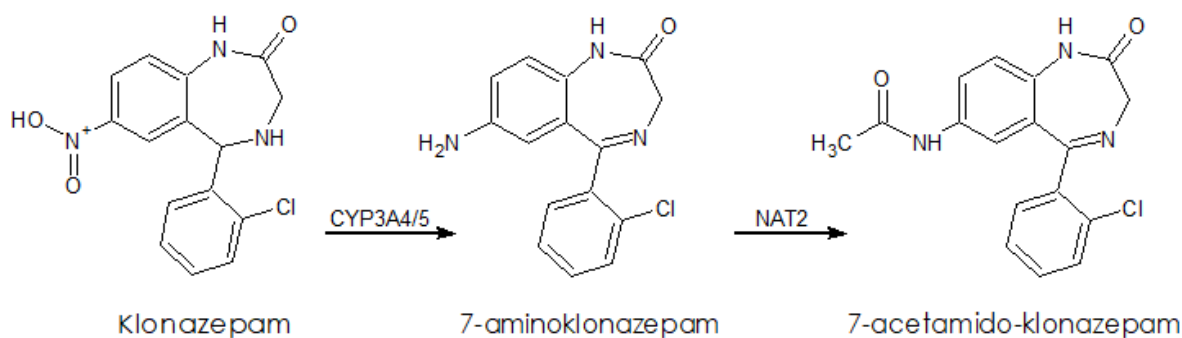
A pszicho- és neurofarmakológiában igen gyakran vetődik föl igény a genetikai vizsgálatokon alapuló individualizált gyógyszerválasztás iránt, hiszen az alkalmazott szerek gyakran évekig tartó alkalmazása igen súlyos mellékhatásokat eredményezhet (Lazáry *et al.* 2016). A gyógyszerhatást a genetikai változók mellett az életkor, a nem, a hormonális állapot, az egyénre ható környezeti tényezők, étkezés, dohányzás, a társbetegségek, valamint a párhuzamos gyógyszer-szedés is nagymértékben befolyásolja.

2.6 Leggyakrabban alkalmazott gyógyszerek

2.6.1 Klonazepam

A klonazepam a nagy potenciálú benzodiazepinek közé tartozik, eredetileg, mint antiepileptikus szert hozták forgalomba, de adjuváns szerként bipoláris zavarban és szkizofréniában szenvedő betegek terápiájában is alkalmazzák (Mendonca Junior *et al.* 2015). Nyugtató, izomlazító és anxiolitikus hatással rendelkezik, így alkalmas pánikrohamok, generalizált szorongás, szociális fóbiák kezelésére egyaránt. A klonazepam farmakológiai hatásának pontos mechanizmusa nem teljesen tisztázott, de a posztzinaptikus GABA_A receptorok benzodiazepin kötőhelyein keresztül fokozza az agyban a GABA hatását (Jenner *et al.* 1986).

A klonazepamra extenzív metabolizmus jellemző. Elsődlegesen a CYP3A4 enzim katalizálta nitro-redukcióval 7-aminoklonazepammá alakul, melyet a polimorf NAT2 enzim N-acetilez tovább 7-acetamido-klonazepammá (Eschenhof 1973) (3. ábra).



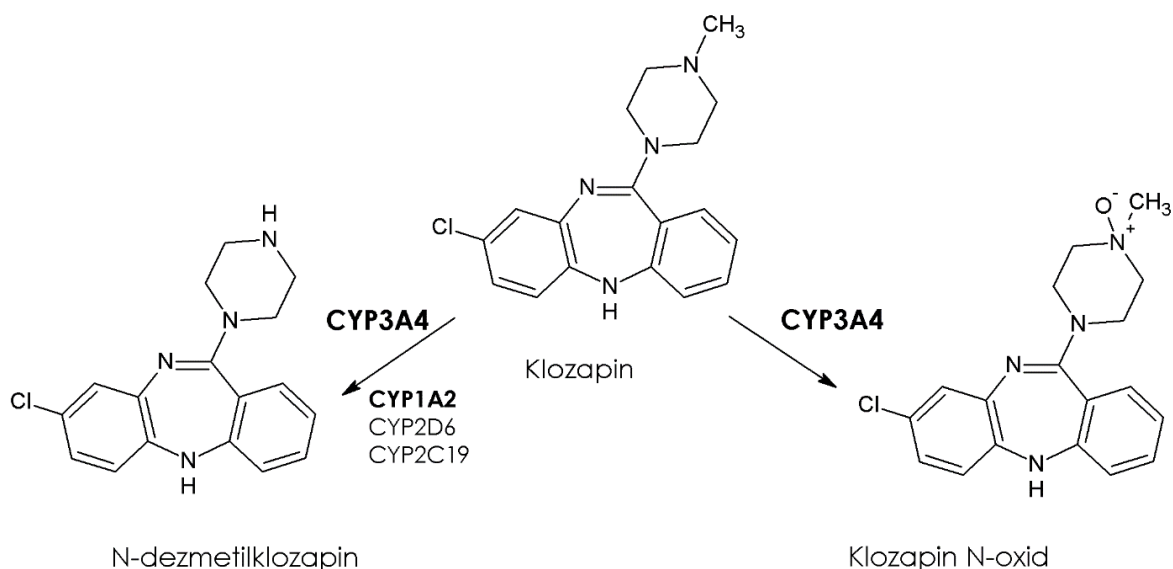
3. ÁBRA: A KLONAZEPAM METABOLIZMUSA

A páciensek többsége jól tolerálja, de mellékhatásként álmoságot, szédülést és zavartságot okozhat. Szedatív hatása időseknél nagyobb problémát jelent az öregedéssel járó változások miatt, nagyobb a sérülésekkel járó esések kockázata (Pariente *et al.* 2008; Sylvestre *et al.* 2012). Hosszú távú használata toleranciához és függőséghez vezethet, a kezelés leállításával pedig megvonási tünetek (remegés, szédülés, izzadás, fejfájás, rohamok) jelentkezhetnek (Chouinard 2004; Riss *et al.* 2008).

2.6.2 Klozapin

A benzizoxazol származék klozapin tekinthető a második generációs antipszichotikumok prototípusának. Hatása összetett, egyrészt gyengébb dopamin (D_2) receptor antagonist, mint az első generációs szerek, emiatt gyakorlatilag nem okoz extrapiramidális tüneteket. Másrészt a klozapin erős affinitása az adrenerg, szerotonerg ($5HT_{2A}$) és kolinerg receptorokhoz egyaránt hozzájárulhat a hatásosságához (kognitív funkciók javulása). A mai napig a leghatékonyabb ágens terápia-rezisztens szkizofrén betegek kezelésében (Wenthur és Lindsley 2013). Ugyanakkor akadnak mellékhatásai (rohamok, szedáció, vércukorszint emelkedés, súlygyarapodás), melyek kifejezettebbek a többi második generációs antipszichotikumhoz képest (Haddad és Sharma 2007). A hepatotoxicitás, szívizomgyulladás és az agranulocitózis veszélye miatt a hematológiai és biokémiai paraméterek folyamatos ellenőrzése javasolt (Ng *et al.* 2014).

A klozapin a májban számos metabolitot eredményezve, intenzíven bomlik le. CYP enzimek által katalizált N-demetiláció, N-oxidáció és hidroxiláció egyaránt végbemehet, a „Fázis 2” folyamatok során pedig glükuronid és szulfát konjugátumok képződnek (Schaber *et al.* 2001). Két fő metabolitja az inaktív klozapin N-oxid és a farmakológiailag aktív N-dezmetilklozapin (4. ábra).



4. ÁBRA: A KLOZAPIN MAJOR METABOLITJAI

A norklozapin hatása némiképp eltér az anyavegyületétől (parciális D_2 receptor agonista), de annak hatását kiegészítve, hozzájárulhat az antipszichotikus profil

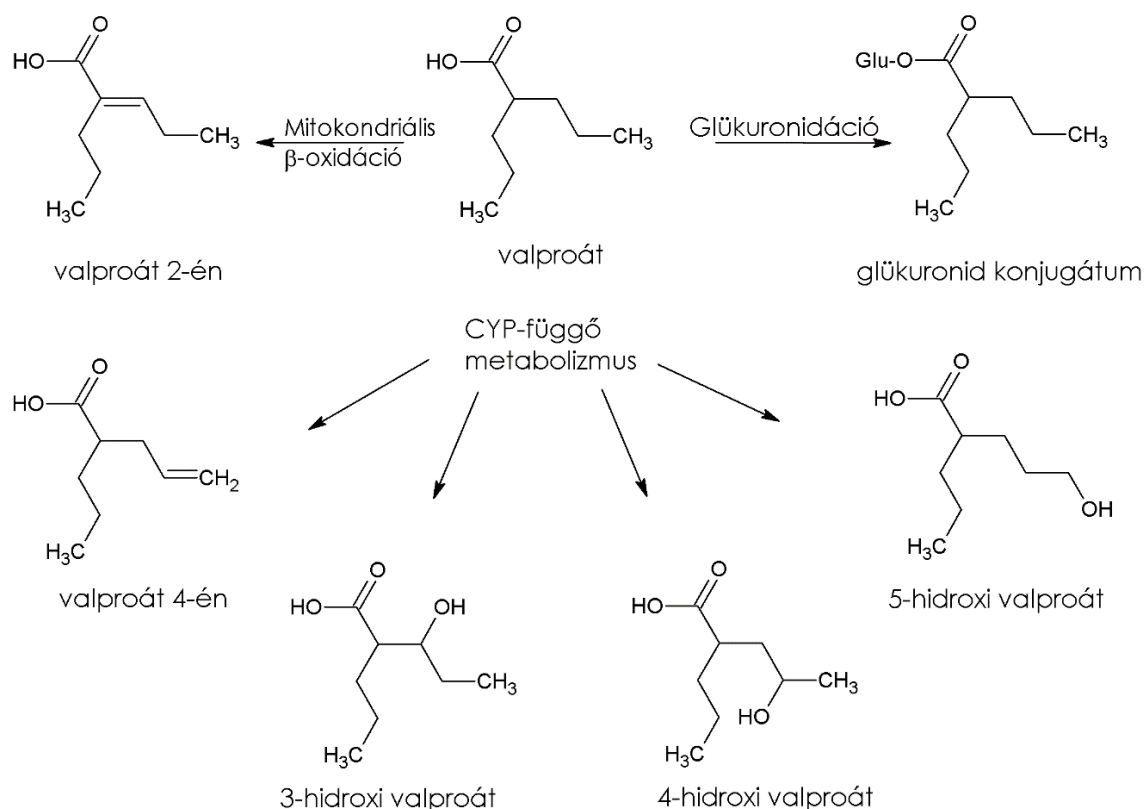
kialakulásához (Lameh *et al.* 2007), bár mint önálló antipszichotikus ágens, klinikai fázis II vizsgálatok során nem mutatott hatást (Mendoza és Lindenmayer 2009). A mai napig vitatott a klozapin lebontásában részt vevő CYP enzimek klinikai relevanciája. A CYP3A4 klozapin N-oxid keletkezésében betöltött szerepe egyértelmű, de az aktív metabolit képződésében több CYP izoforma is részt vehet (Linnet és Olesen 1997). Számos klinikai vizsgálat szolgáltat indirekt bizonyítékot a CYP1A2 és a CYP3A4 enzimek fő szerepéről az N-demetilációban. *In vitro* a CYP2C19 és a CYP2D6 enzimek szerepe is felmerült, de az *in vivo* vizsgálatok eredményei ellentmondóak (Jaquenoud Sirot *et al.* 2009; Ghassabian *et al.* 2010).

2.6.3 Valproát

Antiepileptikus kezelés esetén az egyik elsőként választott hatóanyag a valproát. Hatása összetett, egyrészt fokozza a GABA gátló hatását, modulálja a feszültségfüggő ioncsatornákat, valamint N-metil-D-aszpartát (NMDA) receptor antagonistaként csökkenti a glutamát serkentő hatását (Deckers *et al.* 2000). Számos esetben hatásos: epilepsziában generalizált és parciális rohamok esetén, *status epilepticus* akut kezelésében, de hangulatjavító hatása miatt bipoláris zavar mániás epizódjának kezelésében, valamint migrénes fejfájás megelőzésében is (Johannessen és Johannessen 2003).

Általában jól tolerálható, azonban komoly mellékhatások is előfordulhatnak (hepatotoxicitás, encephalopathia, csontvelő-károsodás) (Nanau és Neuman 2013). Gyermekekben a komoly mellékhatások megjelenésének kockázata nagyobb. A valproát indukálta toxicitás megjelenéséért az anyavegyület és telítetlen metabolitjai egyaránt felelősek lehetnek (Siemes *et al.* 1993).

A valproát egy telített, elágazó láncú zsírsav, mely a májban intenzíven metabolizálódik, hidrox- és telítetlen szénláncú metabolitokat, valamint glükuronid konjugátumot képezve (5. ábra). Felnőttekben nagyrészt glükuronid-konjugátum formájában, valamint mitokondriális β -oxidációval keletkező metabolitként (pl: valproát 2-én) ürül a szervezetből.



5. ÁBRA: A VALPROÁT METABOLIZMUSA

A CYP enzimek a valproát dózis mindössze 10-15 %-ának metabolizmusáért felelősek, 3-, 4- és 5-hidroxi metabolitok, valamint egy telítetlen 4-én metabolit képződését katalizálják. A lebontásban főként a CYP2C9 enzim, kisebb mértékben a CYP2A6 és a CYP2B6 enzimek vesznek részt (Kiang *et al.* 2006). Azokban az esetekben viszont, amikor a glükuronidáció vagy a mitokondriális β -oxidáció nem, vagy gyengén működik, mint például gyermekekben, a CYP2C9 enzim szerepe meghatározó. A kor függő metabolizmusnak szerepe lehet a valproát indukálta mellékhatások megjelenésében is.

3 CÉLKITŰZÉSEK

Jelen kutatómunka célja, hogy a gyógyszer-metabolizáló képesség meghatározásával segítséget nyújtson a pszichofarmakoterápiában részesülő betegek kezelésének optimalizálásához, amellyel elkerülhető a felesleges gyógyszerfogyasztás és megelőzhető a súlyos mellékhatások kialakulása.

Ehhez elsősorban tisztázni kell, hogyan alakul az egyes pszichofarmakonok (klonazepam, klozapin, valproát) sorsa a szervezetben: 1. metabolizálódna-e a CYP enzimeken keresztül, vagy változatlan formában ürülnek, 2. a metabolikus átalakulást mely CYP enzimek katalizálják, 3. keletkeznek-e pl. aktív vagy toxikus metabolitok. Irodalmi *in vitro* és *in vivo* adatok a klonazepam lebontásában a CYP3A enzimek szerepét emelik ki. A klozapin metabolizmusával kapcsolatban viszont a CYP1A2, a CYP2C19, a CYP2D6 és a CYP3A enzimek lehetséges szerepét említik, nem ritkán egymásnak ellentmondó állításokkal. A valproát esetében major CYP enzimként a CYP2C9 enzimet jelölték meg, a CYP2A6 és a CYP2B6 minor részvételével. A CYP2C9, a CYP2C19, a CYP2D6 és a CYP3A5 rendkívül polimorf, az egyes allélvariánsok eltérő katalitikus aktivitásokhoz vezetnek. A gyógyszer-metabolizáló képességet viszont egyéb, nem-genetikai tényezők is befolyásolhatják, így a megjelenő fenotípus nem feltétlenül azonos a beteg genotípusából becsülhető fenotípussal, ezért szükséges az adott enzim expressziójának ismerete is a metabolizáló képesség pontos meghatározásához.

Tehát az alábbi kérdésekre kerestünk válaszokat:

1. Mely izoenzimek vesznek részt az egyes hatóanyagok lebontásában?
2. Az azonosított enzimek genetikai polimorfizmusa és/vagy expressziója milyen hatással van az adott hatóanyag vérszintjére? A hatóanyagok és metabolitjaik szérum koncentrációja mutat-e összefüggést a betegek gyógyszer-lebontó képességével?
3. A betegek CYP-statusa alapján meghatározható-e a terápiás vérszint eléréséhez szükséges céldózis?
4. Milyen előnyei lehetnek a CYPtest™ alapú gyógyszeres terápiának a klinikai gyakorlatban jelenleg alkalmazott tüneti terápiával szemben?

4 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 A felhasznált anyagok

Az *in vitro* gátlásvizsgálatok során felhasznált gátlószerek (α -naftoflavon, szulfafenazol, tiklopidin, quinidin, ketokonazol) a Sigma-Aldrich (Darmstadt, Németország) termékei voltak. A klozapint, a norklozapint és a klozapin N-oxidot a Santa Cruz Biotechnology-től (Santa Cruz, CA) rendeltük, a klonazepamot (Rivotril injekció) a Semmelweis Egyetem Pszichiátriai és Pszichoterápiás Klinikájától kaptuk, a 7-aminoklonazepam standard pedig a Cerilliant (Round Rock, Texas, USA) terméke volt. A kísérletek során felhasznált egyéb anyagok a Merck (Darmstadt, Németország) és Reanal (Budapest) termékei voltak.

4.2 *In vitro* CYP enzimtéreképezés

Az *in vitro* CYP-gátlás vizsgálatokat humán májszövetből preparált mikroszóma frakcióval végeztük. A klonazepam és a klozapin metabolizmusában szerepet játszó CYP izoenzimek azonosítására CYP szelektív gátlószereket alkalmaztunk: α -naftoflavon 10 μ M és 100 μ M (CYP1A2), szulfafenazol 10 μ M és 100 μ M (CYP2C9), tiklopidin 50 μ M (CYP2C19), quinidin 24 μ M (CYP2D6), ketokonazol 10 μ M (CYP3A4). Meghatároztuk az egyes gátlószerek jelenlétében termelődő metabolitok (7-aminoklonazepam, norklozapin, klozapin N-oxid metabolitok) mennyiségét, és a gátlás mértékét a gátlószer-mentes inkubálás (kontroll) %-ában adtuk meg. Az inkubációs elegy tartalmazta a humán mikroszómát (1 mg/ml), a vizsgált hatóanyagot (klonazepam 5 μ M, klozapin 25 μ M), az egyes gátlószereket és 0,1 M Tris-HCl puffert (pH=7,4). A CYP enzimek működéséhez szükséges elektronokat a NADPH-regeneráló rendszer (1 mM NADPH, 10 mM glükóz 6-foszfát, 5 mM $MgCl_2$, 2 U/ml glükóz 6-foszfát-dehidrogenáz) biztosította. Az inkubációt 37 °C-on végeztük, a reakciót jéghideg belső standard (karbamazepin) tartalmú acetonitril hozzáadásával állítottuk le. A mintákat 10 percig 15000 x g-vel centrifugáltuk. Az anyavegyület és a metabolitok meghatározása HPLC-MS/MS analitikai módszerrel történt a felülúszókból. A folyadékkromatográfiás elválasztáshoz Inertsil ODS-4 (75×2.1 mm, 3 μ m) oszlopot (GL Sciences Inc., Tokyo, Japan) használtunk, a mozgófázis 0,1% hangyasavat tartalmazó acetonitril volt. A vegyületek ionizációja pozitív ESI ionforrással (elektrospray ionizáció)

valósult meg, az analizátor multiple reaction monitoring (MRM) módban működött. Az MRM átmeneteket a 8. táblázat tartalmazza.

8. TÁBLÁZAT: A VIZSGÁLT MRM ÁTMENETEK

Hatóanyag	MRM átmenetek	Metabolitok	MRM átmenetek	
Klozapin	327/270	Klozapin N-Oxid	343/192	343/256
	327/192	N-dezmetil klozapin	313/192	313/270
Klonazepam	316/270	7-aminoklonazepam	286/121	
	316/214		286/222	

4.3 Humán minták

Az MTA Természettudományi Kutatóközpont Metabolikus Gyógyszer-kölcsönhatások Kutatócsoportja rendelkezik a Tudományos és Kutatásetikai Bizottság szükséges engedélyeivel humán minták tudományos célból történő felhasználásához.

Az *in vitro* CYP enzimtérfékezéshez használt humán májszövetet a Semmelweis Egyetem Transzplantációs és Sebészeti Klinikája biztosította.

A pszichiátriai betegek vérmintái a Semmelweis Egyetem Pszichiátriai és Pszichoterápiás Klinikájáról érkeztek. Minden vizsgálat a betegek tájékoztatásával és beleegyezésével történt. A betegek a kauázusi (fehér) populációhoz tartoztak. A vizsgálatokba csak stabil klonazepam, illetve klozapin kezelésen lévő betegeket vontunk be. A mintavétel a CYP vizsgálatához és a vérszint mérésekhez minden esetben a reggeli gyógyszer-bevételt megelőzően történt. Minden beteg gyógyszerelését rögzítettük a mintavételt megelőző héten. A pszichiátriai kezelések alapvetően antipszichotikumokkal (quetiapin, olanzapin, aripiprazol, klozapin, risperidon, haloperidol) és hangulatjavítókkal (valproát, lamotrigin, karbamazepin, lítium) történtek, és amennyiben szükséges volt antidepresszánsokat (fluoxetin, paroxetin, bupropion vagy venlafaxin) vagy nyugtatókat (zopiklon, zolpidem) is alkalmaztak.

A klonazepam kezelés a klinikai gyakorlat szerint zajlott, alacsony dózissal indult (0,5 mg/nap), melyet fokozatosan emeltek az optimális klinikai válasz megjelenéséig (0,5 – 6,5 mg/nap), mely általában 5 napot vett igénybe.

Amennyiben agitáció, agresszió vagy mánia jelei mutatkoztak, magasabb induló dózist alkalmaztak.

A 92 klozapinnal kezelt betegből csak 18 részesült monoterápiában, a betegek többsége kiegészítő antipszichotikum (haloperidol, risperidone, aripiprazol vagy amiszulprid), vagy antikonvulzáns (valproát, klonazepam vagy lamotrigin) kezelést is kapott. A betegek közel fele (N=41) szedett β -receptor blokkoló propranololt vagy metoprololt. A klonazepam kezelése szintén alacsony dózissal indultak (12,5 – 25 mg/nap), és a terápiás hatás eléréséig naponta emelték 12,5 – 50 mg-mal. A vizsgálatokban részt vevő pszichiátriai betegek demográfiai adatait tartalmazza a 9. táblázat.

9. TÁBLÁZAT: A PSZICHIÁTRIAI PÁCIENSEK DEMOGRÁFIAI ADATAI

	Klonazepam	Klozapin
Páciensek	98	92
Nem, férfiak/nők	39/59	38/54
Diagnózis		
Szkizofrénia	47	73
Szkizoaffektív zavar	33	15
Bipoláris zavar	18	
Egyéb		4
Dohányzók	na	35
Kor (év) [#]	43 (19-70)	42 (17-74)
Napi dózis (mg) [#]	2 (0,5-6,5)	200 (50-700)
Testtömeg (kg) [#]	73,7 (61,25-87)	76 (51-129)

na - nincs adat, [#]medián (min-max)

Az epilepsziás gyermekek bevonásával végzett vizsgálatok két lépcsőben történtek a Heim Pál Gyermekkorház és a Semmelweis Egyetem II. számú Gyermekklinikájának együttműködésével. Minden vizsgálat a szülők illetve gondviselők tájékoztatásával és beleegyezésével történt.

Az első vizsgálat-sorozatba 50, újonnan diagnosztizált epilepsziás gyermeket (< 15 év) vontunk be, akiknek a valproát terápia kezdete előtt vizsgáltuk a CYP2C9-statusát. A vizsgálatba nem kerültek be egyéb antiepileptikus terápiában részesülő betegek, vagy olyan gyermekek, akiknél a valproát kezelést megszakították. A

betegek demográfiai adatait és az antikonvulzáns terápia részleteit rögzítettük. A gyermekek (fiúk/lányok: 20/30) átlagéletkora 6,75 év volt (0,5-15 év között), és mindegyikük a kaukázusi (fehér) populációba tartozott. A gyermekek kizárólag valproát monoterápiában részesültek, melynek céldózisát a klinikai gyakorlat alapján testtömeg kg-ra vonatkoztatva állítottak be. A kezelések alacsony dózissal indultak (10-15 mg/kg), amit folyamatosan emeltek a tervezett dózis eléréséig, általában 5-10 napon keresztül. A valproát vérszintek ellenőrzése a kezelés kezdete utáni 2. és 4. héten történt. Dózis módosítás történt, amennyiben a 2. heti szérumkoncentráció a terápiás tartományon kívül esett. A 4. heti szérumszinteket stabil, „steady-state” koncentrációnak, az alkalmazott dózisokat pedig fenntartó dózissnak tekintettük.

A második vizsgálat 99, újonnan diagnosztizált epilepsziás gyermek (<15 év) bevonásával történt, a betegek egyéb kezelésben nem, csak valproát monoterápiában részesültek. A kontroll csoportban (N=47) a kezelés a konvencionális terápiát követte, CYP vizsgálat nem történt. A CYPtest csoportban (n=52) a dozírozás az előző vizsgálat eredményei alapján, a CYP2C9-status előzetes felmérésével került beállításra (ld.: 5.2.3 fejezet). A valproát koncentrációk ellenőrzéséhez a mintavétel a terápia kezdetét követően, minden 2. héten történt, a reggeli gyógyszer-bevételt megelőzően. A vérszintmérés eredményei alapján szükség esetén a dózisok módosítására is sor kerülhetett. A klinikai adatokat 2006 és 2014 között gyűjtöttük, 2010-től kezdődően minden gyermek CYP2C9-statusát vizsgáltuk az antikonvulzáns kezelés elindítása előtt. Valamint ellenőriztük a hematológiai (vörös- és fehérvérsejtszám, vérlemezke szám) és biokémiai paramétereket (szérum alkalikus foszfatáz (ALP), gamma-glutamil transzferáz (GGT), glutamát-oxálacetát transzamináz (GOT), glutamát-piruvát transzamináz (GPT), kalcium és foszfor szintek) is, és figyelemmel kísértük alakulásukat a kezelés folyamán. A vér ammónia koncentrációját csak akkor vizsgáltuk, ha a tünetek indokolták. Minden mellékhatást rögzítettünk, és enyhe (álmosság, fáradtság, vizeelési kényszer és hajhullás) vagy komoly (hiperammonémia, hematológiai betegségek) kategóriába soroltuk azokat.

4.4 CYPtest™

CYPtest™ egy kétlépcsős diagnosztikai eljárás, amely a CYP génhibák azonosításával meghatározott genotípus és a leukocitákban mérhető CYP mRNS szintek alapján határozza meg a betegek gyógyszer-metabolizáló képességét (Temesvári *et al.* 2012). A betegek *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6* és *CYP3A5* genotípusát az európai fehér populációban leggyakrabban előforduló allélvariánsok vizsgálatával határoztuk meg. A kutatócsoport által kifejlesztett módszer szerint a CYP génhibával nem rendelkező egyéneknél a perifériás vérből izolált fehérvérsejtek CYP mRNS expressziójából következtetni lehet a máj specifikus CYP enzimaktivitásaira (Temesvári *et al.* 2012). Ugyanis a CYP1A2, a CYP2C9, a CYP2C19 és a CYP3A4 enzimek májban mérhető aktivitása szoros korrelációt mutatott a leukocitákban mérhető CYP expresszióval. A betegek gyógyszer-lebontó képessége a CYP expresszió alapján 3 kategóriába osztható: alacsony expresszálók (PM), átlagos expresszálók (IM), és magas expressziós szintekkel (EM) rendelkezők. A csoportok közötti cut-off értékeket tartalmazza a 10. táblázat.

10. TÁBLÁZAT: A GYÓGYSZER-METABOLIZÁLÓ KÉPESSÉG OSZTÁLYOZÁSA A FEHÉRVÉRSEJTEKBŐL MÉRHETŐ CYP MRNS SZINTEK ALAPJÁN

	PM/IM	IM/EM
	Cut-off értékek	
CYP1A2	10^{-5}	$5 \cdot 10^{-4}$
CYP2C9	$2 \cdot 10^{-6}$	10^{-5}
CYP2C19	10^{-6}	10^{-5}
CYP3A4	10^{-6}	10^{-4}

4.5 Fehérvérsejt izolálás

500 µl alvadásgátolt vért 1 ml vörösvértest lízis pufferben (155 mM NH₄Cl; 10 mM KHCO₃; 0,1 mM EDTA; pH=7,2-7,5) szuszpendáltunk, majd 10 percig szobahőmérsékleten történő lassú forgatás után 5 percen keresztül 1000 x g-n centrifugáltuk. A felülúszó eltávolítása után újabb 1 ml lízis pufferrel mostuk a fehérvérsejteket. Centrifugálás után a fehérvérsejtek az eppendorf cső alján fehér csapadék formájában gyűlnek össze.

4.5.1 DNS izolálás

A fehérvérsejtek egy részét 100 µl PBS oldatban szuszpendáltuk. A DNS izolálás Quick-DNA™ Universal Kit-tel (ZYMO Research, Irvine, CA) a gyártó utasításai alapján történt. A DNS koncentrációjának és tisztaságának meghatározását NanoDrop 1000 spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE) végeztük.

4.5.2 RNS izolálás

Az izolált fehérvérsejtek másik feléhez ($\sim 10^7$ leukocitához) 1 ml TRI reagens-t (MRC, Cincinnati, OH) adtunk. Az RNS izolálást a gyártó által megadottak szerint végeztük. Az extrakcióhoz 200 µl jéghideg kloroformot használtunk, majd centrifugáltuk a mintákat (10.000 x g, 15 perc, 4 °C). Az RNS-t tartalmazó felső, áttetsző vizes fázist új csőbe pipettáztuk, majd 0,5 ml izopropanollal csaptuk ki az RNS-t. Centrifugálás (12.000 x g, 8 perc, 4 °C) után 75%-os etanollal mostuk a csapadékot, amit az etanol elpárologtatása után 0,01% dietil pirokarbonáttal (DEPC) kezelt vízben oldottunk vissza. Az RNS koncentrációjának és tisztaságának meghatározását szintén NanoDrop 1000 spektrofotométerrel végeztük el.

4.6 Reverz transzkripció

Az RNS preparátumok reverz transzkripcióját Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit-tel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) végeztük a gyártó által közölt utasítások alapján. 5 µg RNS reverz transzkripciójának hőmérséklet protokollja: 10 perc 25 °C-on, 30 perc 50 °C-on végül 5 perc 85 °C-on.

4.7 Polimeráz láncreakció

A PCR méréseinket az amplifikálni kívánt DNS szakaszt közrefogó primer párral és TaqMan próbákkal végeztük. Master-mixet használtunk, amely tartalmazza a nukleotidokat, a DNS polimerázt valamint az enzim működéséhez szükséges reakciópuffert. A TaqMan próba egy duplán jelölt oligonukleotid, amelynek 5' végén egy nagy energiájú (donor) fluorofór, a *riporter*, a 3' végén pedig egy kis energiájú (akceptor) fluorofor molekula, a *quencher* található. A targethez hibridizált próba fluoroforjai olyan közel vannak egymáshoz, hogy létrejön köztük a Förster-féle energiaátadás (FRET) folyamata, azaz a *quencher* molekula elnyeli a

riporter molekula energiáját. A reakció során a DNS polimeráz 5'- 3' irányú exonukleáz aktivitása nukleotidokra bontja a próbát. A hidrolízis révén megszűnik a quencher molekula fényt elnyelő szerepe, a gerjesztett *riporter* molekula által emittált fény detektálhatóvá válik. Az emittált fluoreszcencia arányos a specifikus célszekvencia aktuális mennyiségével.

Az SNP meghatározásokhoz és a mRNS expressziós mérésekhez használt primerek és próbák tervezését az NCBI Primer Designing Tool (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) szoftverével végeztük, és az IDT OligoAnalyzerTool (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) segítségével analizáltuk. A reakciókat CFX96 Real-Time PCR (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) készülékeken végeztük.

4.7.1 Genotipizálás

A genotipizálás során kétféle, eltérő hullámhosszon emittáló fluorofórral jelölt próbát alkalmaztunk. A két próba alkalmazásával könnyen elkülöníthető a vad-típusú és a mutációt hordozó allél, ugyanis szekvenciájukban eltérés csak a mutációs pontban van. A báziscserével (*CYP2C9*2*, *CYP2C9*3*, *CYP2C19*2*, *CYP2C19*3*, *CYP2C19*4*, *CYP2C19*17*, *CYP2D6*4*, *CYP2D6*10*, *CYP2D6*41*, *CYP3A4*1B*, *CYP3A4*22*, és *CYP3A5*3*), illetve báziskieséssel (*CYP2D6*3* és *CYP2D6*6*) járó polimorfizmusokat TaqMan próbákkal (BioSearch Technologies, Novato, CA) határoztuk meg. A felhasznált primerek és próbák szekvenciáit, az alkalmazott végkoncentrációkat és az annealing hőmérsékletét a Függelék 19. táblázata tartalmazza. A reakciókat Luminaris Probe qPCR Master Mix-szel (Thermo Fisher Scientific) végeztük, a gyártó által javasolt hőmérsékletprofil alapján. A teljes gén deléció (*CYP2D6*5*) vagy többszöröződést (*CYP2D6*N*) TaqMan® Copy Number Assay; Assay ID: Hs00010001_cn (Thermo Fisher Scientific) segítségével mutattuk ki. A *CYP2D6* allél kópia számát a mindig két kópiában előforduló RNase P (TaqMan® Copy Number Reference Assay, Thermo Fisher Scientific) kópia számához viszonyítottuk.

Mivel az egyes *CYP1A2* polimorfizmusok és a *CYP1A2* expresszió között gyenge összefüggéseket írtak le (Ferrari *et al.* 2012), ezért a *CYP1A2* genotípus adatok helyett a leukocitákból mérhető *CYP1A2* mRNS expresszió meghatározásával következtettünk a *CYP1A2* aktivitásokra (Temesvári *et al.* 2012).

A *NAT2* polimorfizmusai miatt a betegek acetiláló képessége eltérő. A *NAT2* acetiláló fenotípus pontos meghatározásához Hein és Doll (2012) által javasolt 4-SNP panelt használtuk: 341T>C (rs1801280), 590G>A (rs1799930), 857G>A (rs1799931) és 191G>A (rs1801279). TaqMan próbák segítségével különítettük el a „lassú-acetiláló” allélokat (*NAT2**5, *NAT2**6, *NAT2**7 és *NAT2**14) a „gyors-acetiláló” vad típusú alléltól (*NAT2**4), melyek szekvenciáit és a reakció során alkalmazott végkoncentrációkat a Függelék 20. táblázata tartalmazza. A reakciókat Luminaris Probe qPCR Master Mix-szel (Thermo Fisher Scientific) végeztük. A 2 polimorf alléllal rendelkező egyéneket soroltuk a „lassú-acetiláló” csoportba, a *NAT2**4 allélt hordozókat „átlagos/gyors-acetilálónak” tekintettük.

Valamennyi SNP genotípus eloszlása megfelelt a Hardy-Weinberg egyensúlynak, az allélgyakoriságok nem tértek el (khí-négyzet próba) az irodalmi adatoktól. (Zanger és Schwab 2013; Zhou *et al.* 2017)

4.7.2 CYP expresszió meghatározása

A fehérvérsejtekben az adott CYP mRNS szintek mérése relatív mennyiségi meghatározáson alapul. Referenciaként a glicerinaldehid 3-foszfát dehidrogenázt (GAPDH-t) kifejező mRNS szinteket tekintettük. A GAPDH, mint „háztartási” gén, állandóan aktív állapotban van, expressziója különböző behatásokra sem változik. Az egyes CYP mRNS mennyiségeket a mintában mért GAPDH és az adott CYP áttörési Cq értékei alapján kalkuláltuk. A két Cq érték különbsége a CYP enzimet kifejező mRNS relatív mennyiségét adja meg:

$$CYP/GAPDH = 2^{-\Delta Cq} \text{ ahol } \Delta Cq = (Cq_{CYP} - Cq_{GAPDH})$$

Az adott CYP enzim metabolizáló képességet a korábban említett cut-off értékek alapján (4.4 fejezet, 10. táblázat) határoztuk meg.

A primereket és a próbákat a Biosearch Technologies szintetizálta (primer és próba szekvenciák a Függelék 21. táblázatban találhatóak). A PCR reakcióhoz 2x Kapa Probe Fast qPCR Master Mix-et (Kapa Biosystems, Wilmington, MA) használtunk, a hőmérsékletprotokoll a gyártó ajánlása szerint zajlott, az annealing hőmérséklete 58 °C volt. Az alkalmazott végkoncentrációkat szintén a Függelék 21. táblázata tartalmazza.

4.8 Vérszint meghatározások

A vérszint mérésekhez közvetlenül a reggeli dózis bevétele előtt történt a vérvétel. A szérum izoláláshoz a natív vérvételi csöveket 10 percig 1000 x g-n centrifugáltuk, majd a felülúszót eppendorf csövekbe pipettáztuk és a mérésekig -20 °C-on tároltuk. A kalibrációs sorok elkészítéséhez „pool”-ozott kontroll szérumot használtunk.

A klonazepam, klozapin és metabolitjaik steady-state koncentrációinak meghatározásához minden egyes vegyületre kalibrációs sorokat készítettünk (klonazepam (2-100 ng/ml), 7-aminoklonazepam (1-100 ng/ml), klozapin (20-1500 ng/ml), norklozapin (20-1000 ng/ml), klozapin N-oxid (50-1000 ng/ml)). A szérum fehérjetartalmát jéghideg, belső standard (karbamazepin) tartalmú acetonitril hozzáadásával csaptuk ki. A HPLC-MS/MS mérés a 4.2 fejezetben leírtak szerint, a minták centrifugálása után a felülúszókból történt.

A valproát vérszintek mérése a Heim Pál Gyermekkórház Madarász utcai részlegének laboratóriumában történt Fluoreszcens Polarizációs Immunoassay (FPIA) (AxSYM Valproic Acid Assay, Abbott Laboratories, IL, USA) használatával.

Az értékelésekhez normalizált vérszinteket használtunk, azaz a mért koncentrációkat elosztottuk a testtömeg kg-ra vonatkoztatott dózissal [(ng/ml)/(mg/kg)].

4.9 Statisztikai értékelések

A statisztikai értékeléseket GRAPHPAD INSTAT (v3.05; GraphPad Software, San Diego, CA, USA) szoftverrel végeztük. A demográfiai adatok, a CYP expresszió, és a genotípusok mint változók hatását az egyes hatóanyagok koncentrációinak alakulására varianciaanalízissel végeztük. A varianciaanalízis modellezésére, a plazmakoncentrációk alakulásában kulcsszerepet játszó faktorok azonosítására számos matematikai modellt kipróbáltunk, de legjobbnak (legkisebb SD értékek, és legkevesebb modellparaméterek) a lineáris modellek bizonyultak.

A dózis és a CYP expresszió bizonyult kulcstényezőnek a klonazepam és klozapin koncentrációinak alakulásában ($P < 0,0005$), de a modell akkor adta a legjobb predikciót, ha a napi dózisokat a testtömeggel normalizáltuk. A 7-aminoklonazepam vérszint kialakulásában a klonazepam koncentráció, a CYP3A4 expresszió és a NAT2 genotípus volt meghatározó ($P < 0,005$). A klonazepam és a

klozapin koncentrációjára alkalmazott statisztikai modell varianciaanalízisen alapult, a napi dózis és a testsúly hatását a koncentrációra a következő egyenlettel fejeztük ki:

$$c = k_1 * \frac{dózis}{ttkg} + k_0$$

1. EGYENLET

ahol c az adott anyavegyület koncentrációja (klonazepam illetve klozapin) ng/ml -ben kifejezve, $dózis$ az alkalmazott napi dózis (mg) és a $ttkg$ a testtömeg kg -ban megadva. A k_0 és k_1 paramétereket külön-külön határoztuk meg az alacsony és átlagos CYP3A4 expressziójú csoportokban egyaránt. A 7-aminoklonazepam koncentrációjára alkalmazott modell szintén varianciaanalízisen alapult:

$$c_{7-aclo} = k_1 * c_{clo} + k_0$$

2. EGYENLET

ahol c_{7-aclo} a 7-aminoklonazepam koncentrációja, a c_{clo} pedig a klonazepam koncentrációja ng/ml -ben kifejezve. A k_0 és k_1 paramétereket külön-külön határoztuk meg a két csoportban, ahol az egyik csoportba tartozott minden alacsony CYP3A4 expressziójú beteg, függetlenül a NAT2 fenotípusától, valamint az átlagos CYP3A4 expresszióval és „gyors-acetiláló” képességgel rendelkező betegek, míg a másik csoportot „lassú-acetiláló”, de átlagos CYP3A4 expressziójú betegek alkották. A k_0 és k_1 együtthatók megállapítása lineáris regresszióval történt, a modellek pontosságát reziduális hibával jellemeztük.

Az optimális vérszint kialakulásához szükséges dózis becslésére az 1. egyenletet alkalmaztuk, egyszerű átrendezéssel:

$$dózis = ttkg * \frac{(c - k_0)}{k_1}$$

3. EGYENLET

Az optimális dózistartomány kiszámításához a klonazepam és a klozapin terápiás tartományainak alsó és felső határait vettük figyelembe (klonazepam esetén: 20 és 70 ng/ml , klozapin: 200 és 600 ng/ml). Az elemzést Matlab R2009b (MathWorks, Natick, Massachusetts, USA) szoftver segítségével végeztük.

A statisztikai értékelésekhez a normalizált vérszinteket, a metabolit/anyavegyület arányokat és a különböző CYP-statusú csoportok optimális terápiás tartományhoz szükséges dóziséigényeit átlag \pm SD és/vagy medián (min-max) értékekben fejeztük

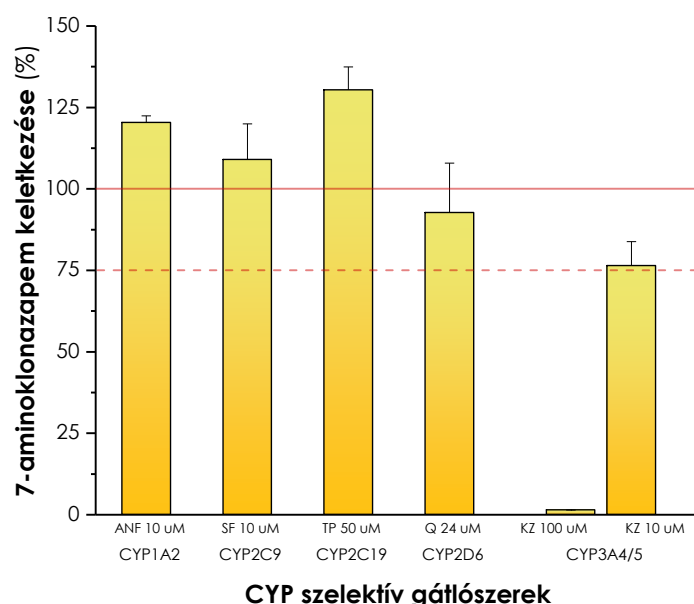
ki. A csoportok közötti szignifikancia vizsgálatra Kruskal-Wallis próbát alkalmaztunk, melyet vagy Mann-Whitney U-próba (klonazepam, klozapin), vagy Dunn-teszt követett (valproát). Statisztikailag szignifikáns különbségnek a $P < 0,05$ értéket tekintettük.

A CYP2C9-status alapján beállított valproát terápia és a konvencionális kezelés közötti különbségeket szintén elemeztük. A biokémiai és hematológiai paraméterek eloszlásainak vizsgálatát Kolmogorov-Szmirnov próbával végeztük. A CYPtest™ és a kontroll csoportok közötti különbségek vizsgálatára Fisher-féle egzakt tesztet használtunk.

5 EREDMÉNYEK

5.1 A klonazepam és a klozapin metabolizmusában résztvevő CYP enzimek azonosítása

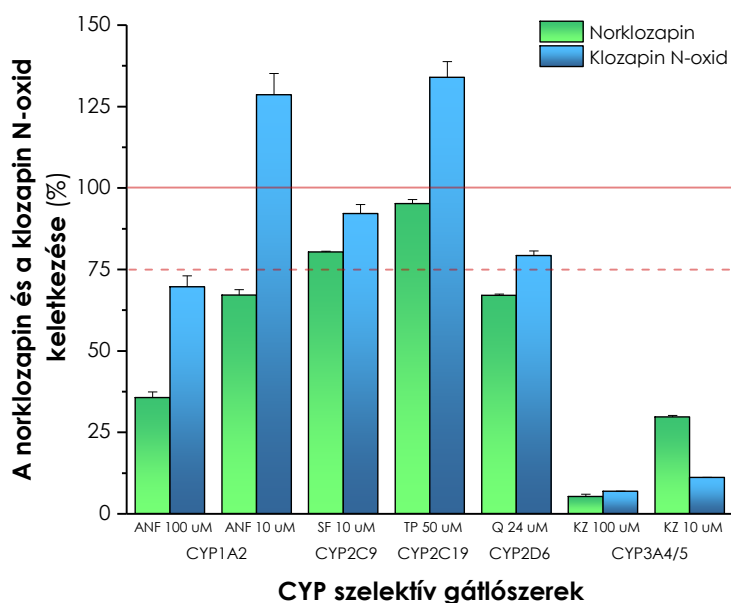
CYP szelektív gátlók alkalmazásával humán máj mikroszómában vizsgáltuk a különböző CYP enzimek szerepét a klonazepam és a klozapin metabolizmusában. A klonazepam és a klozapin koncentrációját a K_m érték közelében alkalmaztuk, és követtük a 7-aminoklonazepam, illetve a norklozapin és a klozapin N-oxid képződését. A CYP gátlás mértékét a gátlószert-mentes (kontroll) enzimreakcióhoz viszonyítottuk. A 25%-nál nagyobb mértékű változást tekintettük jelentős gátlásnak.



6. ÁBRA: A KLONAZEPAM METABOLIZMUSA CYP-SZELEKTÍV GÁTLÓSZEREK JELENLÉTÉBEN (ANF - α -NAFTOFLAVON, SF – SZULFAFENAZOL, TP – TIKLOPIDIN, Q – QUINIDIN, KZ – KETOKONAZOL)

Az *in vitro* gátlásvizsgálat során megállapítottuk, hogy a CYP3A4/5 szelektív ketokonazol szignifikánsan gátolta a klonazepam átalakulását, megerősítve ezzel a CYP3A enzimek szerepét a 7-aminoklonazepam képződésében (6. ábra).

A klozapinnal végzett *in vitro* gátlásvizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy az N-demetilációval keletkező norklozapin képződését elsősorban a CYP3A4 katalizálta, de kisebb mértékben a CYP1A2 és a CYP2D6 is részt vesz a reakcióban.



7. ÁBRA: A CYP ENZIMEK SZEREPE A KLOZAPIN METABOLIZMUSÁBAN (ANF - α -NAFTOFLAVON, SF – SZULFAFENAZOL, TP – TIKLOPIDIN, Q – QUINIDIN, KZ – KETOKONAZOL)

Az N-oxidációval keletkező klozapin N-oxid képződésében a CYP3A4 tölt be meghatározó szerepet (7. ábra).

5.2 *In vivo* vizsgálatok

Az irodalmi és saját *in vitro* vizsgálati eredményeink alapján, a klonazepam és a klozapin metabolizmusában meghatározó szerepet betöltő CYP enzimek klinikai jelentőségét vizsgáltuk szkizofréniában illetve bipoláris zavarban szenvedő betegeknél. Meghatároztuk a betegek CYP-statusát és HPLC-MS/MS technikával a klonazepam és a 7-aminoklonazepam, valamint a klozapin, a norklozapin és a klozapin N-oxid szérumkoncentrációit. Vizsgáltuk a gyógyszer és metabolit vérszintek és a betegek CYP-statusának kapcsolatát, és modellt illesztettünk az összefüggésekre. Az alkalmazott modellek alkalmasnak bizonyultak dózisbecslésre is, melynek helyességét terápiás vérszintű betegeknél ellenőriztük.

A CYP2C9 szerepét a valproát metabolizmusában epilepsziával kezelt gyermekek bevonásával tisztáztuk. Az epilepsziás gyermekek valproát vérszintjeit a Heim Pál Gyermekkorház Madarász utcai kórházában határozták meg. Az összefüggések feltárása lehetőséget teremtett arra, hogy a betegek CYP2C9-statusa alapján a terápiás valproát szint eléréséhez szükséges dózist előre meghatározzuk. A

CYP2C9-status alapú kezelés előnyeit a klasszikus tüneti kezeléshez képest egy további klinikai vizsgálatban igazoltuk.

5.2.1 Klonazepam

Az *in vitro* CYP gátlás vizsgálatok megerősítették a CYP3A enzimek szerepét a klonazepam metabolizmusában. Megvizsgáltuk a CYP3A enzimek klinikai jelentőségét 98 klonazepammal kezelt pszichiátriai betegnél. Meghatároztuk a betegek *CYP3A4* és *CYP3A5* genotípusát, valamint *CYP3A4* expresszióját, és összefüggést kerestünk a stabil klonazepam kezelés mellett kialakult vérszintekkel. Mivel a klonazepam fő metabolitjának, a 7-aminoklonazepamnak a tovább alakításában a NAT2 enzim is szerepet játszik, ezért a NAT2 genotípus alapján megállapítottuk a betegek acetiláló fenotípusát is. A betegeknél tapasztalt genotípus gyakoriságokat és a fenotípus eloszlást a 11. táblázatban tüntettem fel.

11. TÁBLÁZAT: A KLONAZEPAMMAL KEZELT BETEGEK CYP3A-STATUSA ÉS A NAT2 FENOTÍPUSA

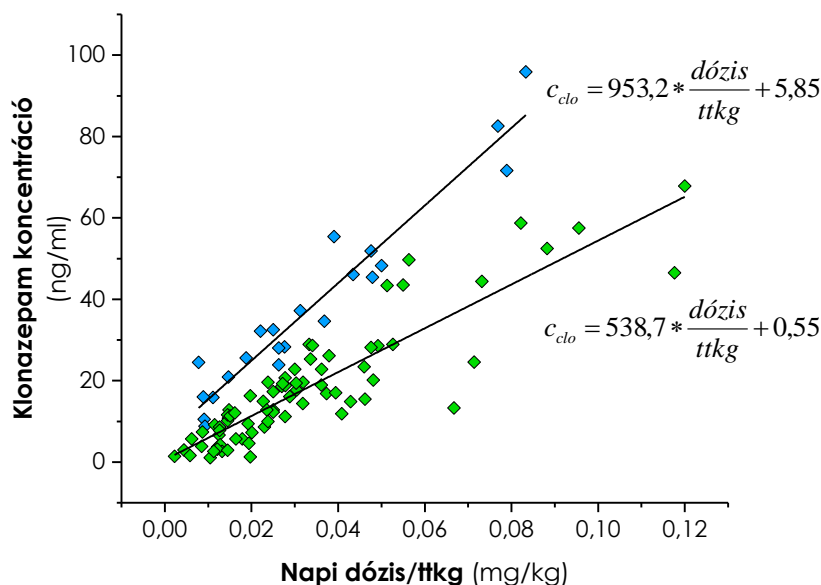
CYP genotípus	N	%
<i>CYP3A4</i>		
*1/*1	78	79,6
*1/*1B	3	3,1
*1/*22	17	17,3
<i>CYP3A5</i>		
*1/*3	8	8,2
*3/*3	90	91,8
CYP3A4 expresszió		
alacsony expresszáló	22	22,4
átlagos expresszáló	75	76,5
magas expresszáló	1	1,02
NAT2 acetiláló fenotípus		
„Lassú-acetiláló”	52	53,1
„Átlagos/gyors-acetiláló”	46	46,9

A klonazepammal kezelt betegek többsége *CYP3A5**3/*3 genotípussal rendelkezett, azaz működőképes CYP3A5 enzimet nem expresszáltak. A 98 páciens közül mindössze 8-an hordoztak vad típusú *CYP3A5**1 allélt. A *CYP3A5**3 allél gyakorisága (0,96) hasonló a kaukázusi populációkban tapasztalható

gyakoriságokhoz (0,88-0,97) (Zanger és Schwab 2013). A páciensek CYP3A4 mRNS expresszió szerint történő kategorizálása viszont megbízhatóbbnak bizonyult, mint a genotípus alapján történő besorolás. A betegek 20 %-a hordozott csökkent (*CYP3A4*22*) vagy fokozott (*CYP3A4*1B*) expresszióval járó allélt, de a *CYP3A4* genotípus és a CYP3A4 mRNS szintek között nem találtunk összefüggést. A CYP3A4-et alacsony vagy átlagos szinten expresszálók aránya ugyanakkora volt a *CYP3A4*1/*1* homozigóta vad genotípusú egyénekben, mint a *CYP3A4*1/*1B* vagy *CYP3A4*1/*22* heterozigóta genotípusúaknál. A páciensek 3/4-énél mértünk átlagos CYP3A4 expressziót, több mint 20 %-uknál alacsony, egy betegnél pedig magas expressziót határoztunk meg. Mivel a pszichiátriai betegeket általában több hatóanyaggal kezelik, a CYP3A4 mRNS szinteket a klonazepammal párhuzamosan alkalmazott hatóanyagok nagyban befolyásolhatják. A betegek többségének terápiájában a klonazepam mellett olyan hatóanyagok szerepeltek, amelyeknek a metabolizmusát a CYP2D6, CYP2B6 vagy a CYP1A2 enzimek katalizálják (aripiprazol, haloperidol, olanzapin, quetiapin, risperidon, bupropion, fluoxetin, paroxetin, venlafaxin), vagy olyan hatóanyagok, amelyek metabolizmusát nem CYP enzimek katalizálják (lamotrigin, valproát). Négy páciens részesült kiegészítő karbamazepin kezelésben. A karbamazepin képes a CYP3A4 enzimet indukálni (Brodie *et al.* 2013), viszont a négy betegnél nem tapasztaltunk magas CYP3A4 mRNS szintet. A NAT2 acetiláló fenotípus meghatározásához Hein és Doll (2012) által javasolt 4-SNP panelt használtuk. Leggyakoribbnak a *NAT2*5* és a *NAT2*6* allélok bizonyultak (34,7 és 35,7%), a *NAT2*7* gyakorisága csupán 2,04%, míg a *NAT2*14* egyáltalán nem fordult elő az általunk vizsgált populációban. Így a 98 páciensből 52 egyén a „lassú-acetiláló” fenotípusba, 46 pedig az „átlagos/gyors-acetiláló” fenotípusú csoportba került (11. táblázat).

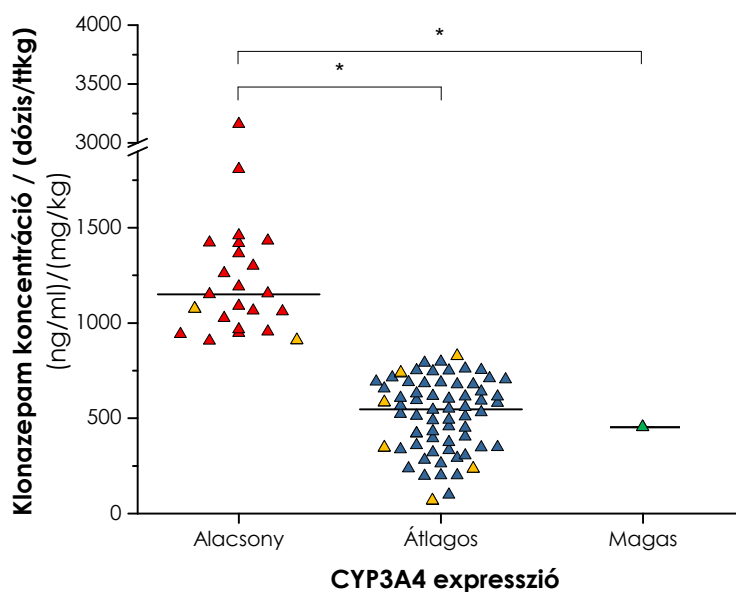
A páciensek *CYP3A5* genotípusának és a NAT2 acetiláló fenotípusnak nem volt hatása a klonazepam vérszintjére, ugyanakkor a CYP3A4 expresszió és a normalizált klonazepam szintek között szoros összefüggést találtunk (8. ábra és 9. ábra). A CYP3A4-et alacsony illetve átlagos/magas szinten expresszáló dózis-

vérszint értékeire ugyanazt a lineáris összefüggést lehetett felállítani (lásd: 1. egyenlet, 4.9 fejezet), csak a k_o és k_l paraméterek különböztek.



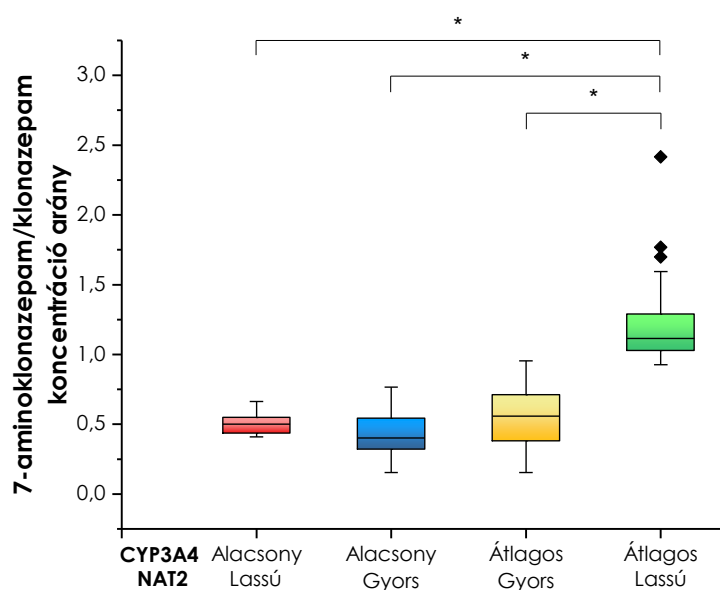
8. ÁBRA: KLONAZEPAM DÓZIS-VÉRSZINT ÖSSZEFÜGGÉS ALACSONY (KÉK ROMBUSZ) ÉS ÁTLAGOS (ZÖLD ROMBUSZ) CYP3A4 EXPRESSZÁLÓ BETEGEKNÉL

A lineáris modellt alkalmasnak találtuk a klonazepam dózis-vérszint összefüggések becslésére, a standard deviáció 6,2 ng/ml volt az alacsony és 6,7 ng/ml volt az átlagos/magas CYP3A4 expresszálóknál (8. ábra). Szignifikánsan magasabb klonazepam szinteket találtunk a CYP3A4-et alacsonyan expresszálók esetén ($1263,5 \pm 482,9$ [(ng/mL)/(mg/kg)]), mint az átlagos expressziós szintekkel rendelkezőknél ($558,5 \pm 202,4$ [(ng/mL)/(mg/kg)]) ($P < 0,0001$) (9. ábra). A magas CYP3A4 expressziós szinttel rendelkező páciens normalizált vérszintje ($452,6$ [(ng/mL)/(mg/kg)]) összemérhető volt az átlagos expressziós szintű csoportéval, így a továbbiakban ez utóbbi két csoportot összevontuk. A CYP3A5 enzim képes ugyanazon szubsztrátok átalakítására, mint a CYP3A4, legfeljebb a szubsztrátokhoz való affinitásban van különbség közöttük. A klonazepam esetén úgy találtuk, hogy az aktív CYP3A5 jelenléte a vad típusú CYP3A5*1-t hordozó betegeknél nem módosította szignifikánsan a klonazepam vérszintjét (9. ábra). Ugyanúgy a CYP3A4 expresszió mértéke határozta meg a klonazepam koncentrációt, mint a CYP3A5*3/*3 genotípusú betegeknél.



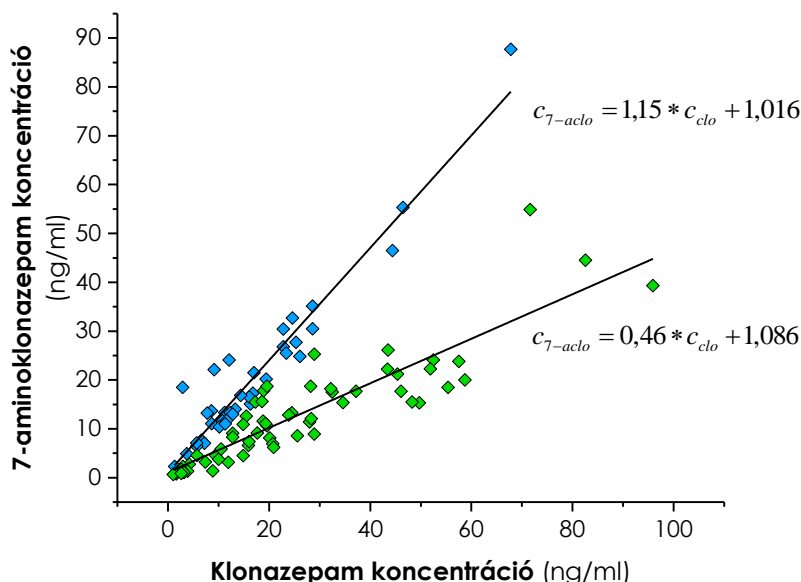
9. ÁBRA: NORMALIZÁLT KLONAZEPAM VÉRSZINTEK ÉS A CYP3A4 EXPRESSZIÓ KÖZÖTTI ÖSSZEFÜGGÉS
* $P < 0,0001$ (▲ A CYP3A5*1/*3 GENOTÍPUSÚ BETEGEKET, — A MEDIÁNT JELÖLI)

Mivel a CYP3A4 metabolizmus során keletkezett 7-aminoklonazepam-ot a NAT2 enzimek N-acetilezik tovább 7-acetamido-klonazepam-má, ezért megvizsgáltuk a CYP3A4 expresszió és a NAT2 genotípusból becsült acetiláló fenotípus hatását a 7-aminoklonazepam vérszintekre. A pácienseket a CYP3A4 expresszió (alacsony és átlagos) és a NAT2 fenotípus („lassú-” és „gyors-acetiláló”) alapján 4 csoportba sorolhattuk. A NAT2 „lassú-acetiláló” és a CYP3A4-et átlagos szinten kifejező



10. ÁBRA: A CYP3A4 EXPRESSZIÓ ÉS A NAT2 ACETILÁLÓ FENOTÍPUS HATÁSA A 7-AMINOKLONAZEPAM/KLONAZEPAM KONCENTRÁCIÓ ARÁNYÁRA * $P < 0,0001$ (A DOBOZ DIAGRAMOKON A MEDIÁN, AZ ALSÓ ÉS FELSŐ KVARTILISEK, ILLETVE A MINIMUM-MAXIMUM SZEREPELNEK, A PONTOK AZ OUTLIEREKET JELÖLIK)

betegeknél magasabb 7-aminoklonazepam/klonazepam arányt mérhettünk az összes többi beteghez képest, amely a 7-aminoklonazepam felhalmozódására utal (10. ábra).



11. ÁBRA: 7-AMINOKLONAZEPAM ÉS A KLONAZEPAM SZÉRUM KONCENTRÁCIÓJÁNAK KAPCSOLATA ÁTLAGOS CYP3A4 EXPRESSZIÓJÚ ÉS LASSÚ NAT2 ACETILÁLÓ BETEGEKNÉL (KÉK ROMBUSZ), ÉS A TÖBBI PÁCIENSNÉL (ZÖLD ROMBUSZ)

A 7-aminoklonazepam koncentrációk és a CYP3A4 expresszió/NAT2 acetiláló fenotípus összefüggéseinek modellezéséhez a betegeket 2 csoportra osztottuk. Az egyik csoportba kerültek a CYP3A4 átlagos expresszióval és lassú NAT2 acetiláló képességgel rendelkező betegek, míg a másik csoportba a 3 egyéb kombináció (alacsony CYP3A4 expresszió és „lassú-” vagy „gyors-acetiláló” képesség, és átlagos CYP3A4 expresszió „gyors-acetiláló” képességgel) került, ugyanis ezekre a kombinációkra a modellek nem adtak szignifikánsan különböző paramétereket. A két csoport modellezéséhez ugyanazt a lineáris összefüggést lehetett alkalmazni (4.9 fejezet, 2. egyenlet), csak a k_o és k_l együtthatók különböztek. A modellek alkalmasak voltak a 7-aminoklonazepam vérszintek becslésére, a standard deviáció 4,5 ng/ml volt az átlagos CYP3A4 expresszióval és „lassú-acetiláló” képességű csoportban, és 4,9 ng/ml volt a többiekénél (11. ábra).

5.2.2 Klozapin

Mivel a klozapin lebontásában számos CYP enzim (CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4) részvételét feltételezik (Olesen és Linnet 2001), és az *in vitro* CYP gátlás

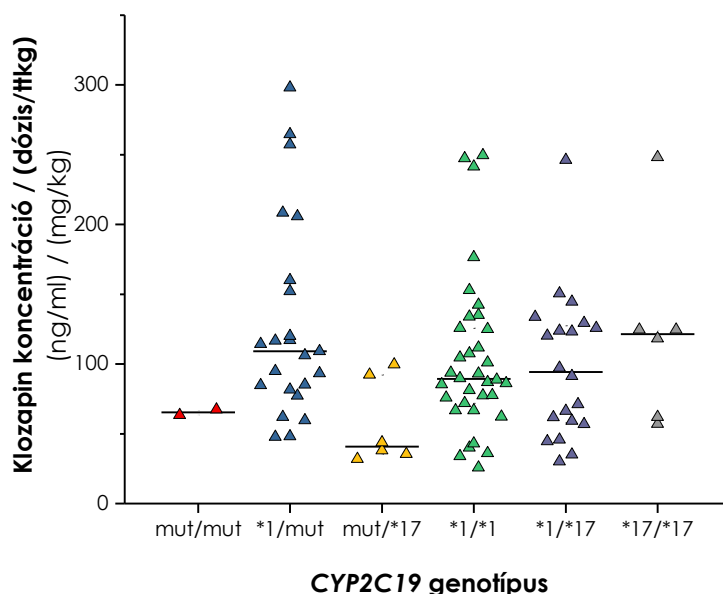
vizsgálataink eredménye is megerősítette a CYP3A4, a CYP1A2 és a CYP2D6 szerepét (5.1 fejezet), ezért a klinikai vizsgálatba bevont 92, zömében szkizofrén betegnél összefüggést kerestünk a CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6 és CYP3A-status (12. táblázat), valamint a klozapin, a klozapin N-oxid és a norklozapin vérszintek között.

12. TÁBLÁZAT: A KLOZAPINNAL KEZELT BETEGEK CYP-STATUSA

CYP genotípus	N	%
<i>CYP2C19*</i>		
*1/*1	35	38,1
*1/mut	23	25
mut/mut	2	2,2
mut/*17	6	6,5
*1/*17	20	21,7
*17/*17	6	6,5
<i>CYP2D6**</i>		
*1/*1	36	39,2
*1/mut	37	40,2
mut/mut	14	15,2
*1/*1xN	5	5,4
<i>CYP3A4</i>		
*1/*1	74	80,4
*1/*1B	5	5,4
*1/*22	13	14,2
<i>CYP3A5</i>		
*1/*3	10	10,9
*3/*3	82	89,1
CYP expresszió		
CYP1A2		
alacsony expresszálók	65	70,7
normál expresszálók	27	29,3
CYP3A4		
alacsony expresszálók	27	29,3
normál expresszálók	62	67,4
magas expresszálók	3	3,3

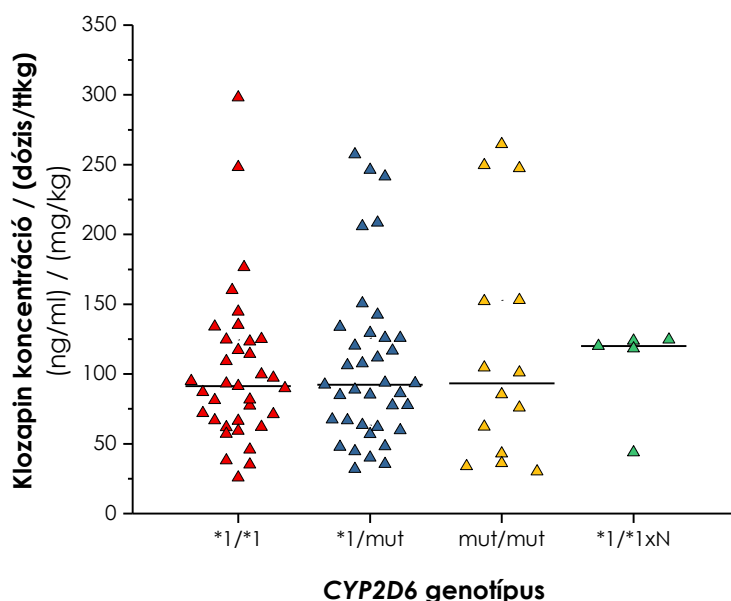
*CYP2C19 mut: *2, *3 és *4; **CYP2D6 mut: *3, *4, *5, *6, *10 és *41

Az *in vitro* gátlásvizsgálatok során a CYP2C19 szelektív tiklopidin jelenlétében nem tapasztaltunk változást a klozapin lebontásában, de mivel több *in vitro* és *in vivo* vizsgálat is szerepet tulajdonított a CYP2C19-nek (Linnet és Olesen 1997; Jaquenoud Sirot *et al.* 2009), ezért meghatároztuk a CYP2C19 genotípusokat is. A 92 klozapinnal kezelt páciens közül 25 hordozott legalább egy funkció-vesztő CYP2C19 allélt (CYP2C19*2, CYP2C19*3 vagy CYP2C19*4), és nagyjából ugyanennyien rendelkeztek funkció-fokozó mutációval (CYP2C19*17), 6 személynél viszont egyszerre detektáltuk mind funkció-vesztő mind funkció-fokozó allélt. A normalizált vérszintek nem különböztek szignifikánsan a funkció-vesztő, vagy a funkció-fokozó mutációval rendelkező páciensek, illetve a homozigóta vad CYP2C19*1/*1 genotípusú betegeknél ($P=0,1083$)(12. ábra).



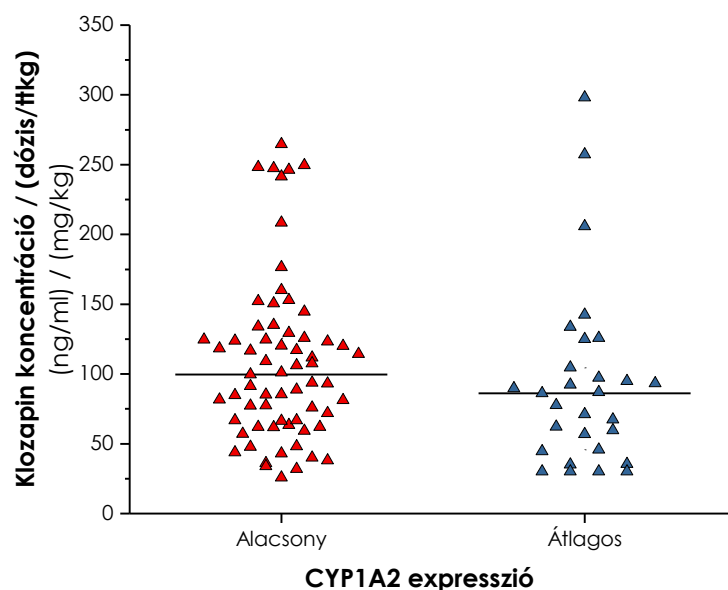
12. ÁBRA: A CYP2C19 GENOTÍPUS HATÁSA A KLOZAPIN VÉRSZINTEKRE (MUT: *2, *3 ÉS *4 ALLÉLOKAT, — A MEDIÁNT JELÖLI)

Nem találtunk összefüggést a CYP2D6 genotípus és a normalizált klozapin szintek között sem ($P=0,8881$)(13. ábra).



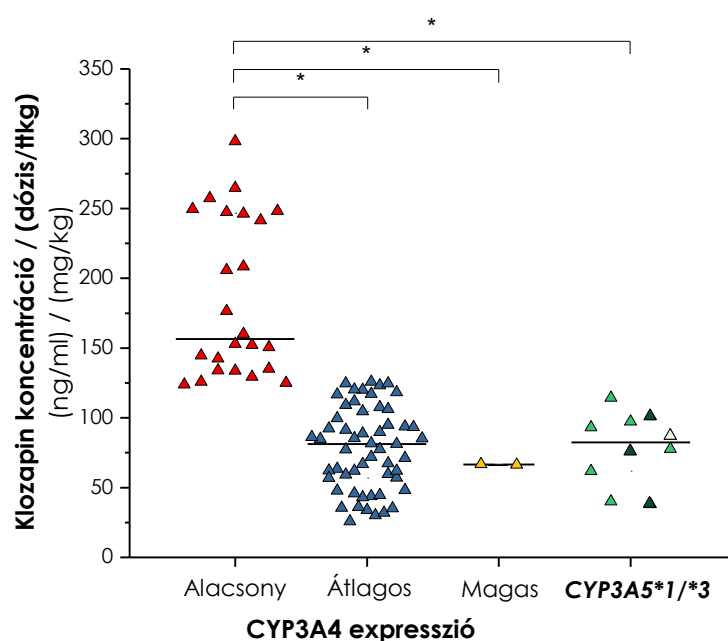
13. ÁBRA: A *CYP2D6* GENOTÍPUS HATÁSA A NORMALIZÁLT KLOZAPIN SZINTEKRE (MUT: *3, *4, *5, *6, *10 ÉS *41, XN: GÉN DUPLIKÁCIÓ, — A MEDIÁNT JELÖLI)

A legtöbb szerző a *CYP1A2* és a *CYP3A4* szerepét tartja meghatározónak a klozapin vérszint kialakulásában (Eiermann *et al.* 1997; Fang *et al.* 1998; Dean 2016), viszont erősen vitatott, hogy melyik milyen mértékben vesz részt a klozapin lebontásában. Betegeink közel 70 %-a alacsony *CYP1A2* expressziót mutatott, 30 %-uknál pedig átlagos *CYP1A2* mRNS szinteket mértünk. A *CYP1A2* indukciójához vezető dohányzás hatása az általunk vizsgált betegpopulációban nem érvényesült. A dohányosok aránya a *CYP1A2*-t alacsony és átlagos szinten expresszáló csoportban megegyezett (alacsony 38 % vs átlagos 37 %, $P=1,00$). A normalizált klozapin szintek és a *CYP1A2* expresszió között szintén nem találtunk összefüggést ($P=0,6639$)(14. ábra).



14. ÁBRA: A CYP1A2 EXPRESSZIÓ HATÁSA A NORMALIZÁLT KLOZAPIN SZINTEKRE (— A MEDIÁNT JELÖLI)

Számos vizsgálat bizonyította a CYP3A4 szerepét terápiás vagy magasabb koncentrációk esetén, de a polimorf CYP3A5 jelentőségét eddig nem tisztázták (Ragia *et al.* 2016). A vizsgálatba bevont betegek közül 10 páciens rendelkezett működőképes enzim termelődéséhez vezető *CYP3A5*1* alléllal, a többiek CYP3A5 enzimet nem expresszáltak (*CYP3A5*3/*3*). A 92 páciensből 13-nál találtunk *CYP3A4*1/*22* és 5-nél *CYP3A4*1/*1B* heterozigóta genotípust. A CYP3A4

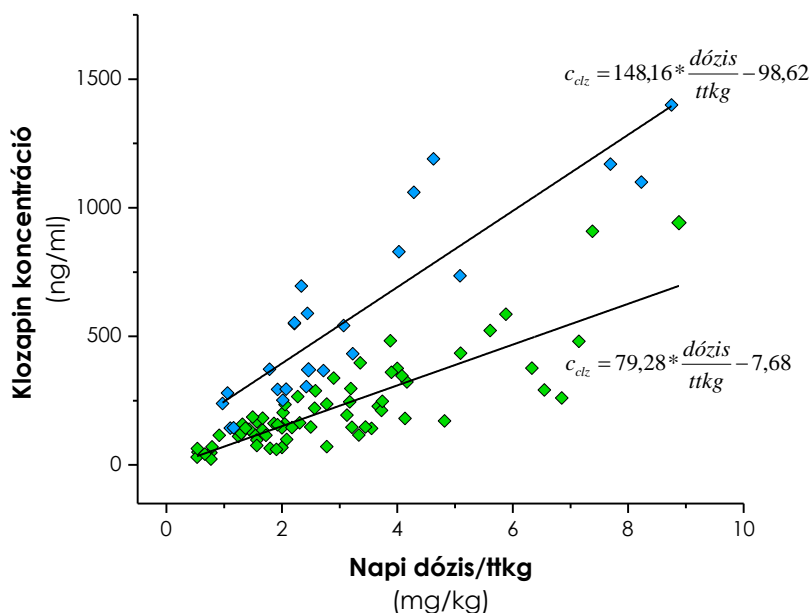


15. ÁBRA: A CYP3A-STATUS HATÁSA A NORMALIZÁLT KLOZAPIN SZINTEKRE, * $P < 0,0001$ (ALACSONY CYP3A4 EXPRESSZÁLÓK (▲), MAGAS CYP3A4 EXPRESSZÁLÓ PÁCIENS (△), — A MEDIÁNT JELÖLI)

genetikai polimorfizmusai nem adnak magyarázatot a betegeknek tapasztalható CYP3A4 mRNS szint különbségekre. A klorapinnal kezelt betegek kétharmada átlagos expressziós szintekkel, 30 %-uk alacsony, és 3 páciens magas expressziós szintekkel rendelkezett (12. táblázat). Szoros összefüggést találtunk a CYP3A4 expresszió és a normalizált klorapin szintek között (15. ábra).

A CYP3A4-et alacsonyan kifejezőknél magasabb vérszintek mutatkoztak, mint az átlagos vagy magas expresszálók esetén ($185,53 \pm 56,53$ vs $78,05 \pm 29,57$ vagy $66,52 \pm 0,25$ (ng/ml)/(mg/kg), $P < 0,0001$). Úgy tűnik, hogy a vérszintek alakulásában a CYP3A5 genotípusnak abban az esetben van jelentősége, ha a beteg alacsony CYP3A4 expresszióval rendelkezik. Ez a megfigyelés ugyan további megerősítést igényel, az aktív CYP3A5 enzimmel rendelkezők relatív kis száma miatt.

Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a CYP2C19 vagy a CYP2D6 genotípusok, illetve a CYP1A2 expresszió nem befolyásolják a kialakuló klorapin koncentrációkat, ellenben a CYP3A4 expresszió szignifikáns hatással van a normalizált klorapin vérszintekre. A CYP3A-status alapján a betegeket 4 csoportba

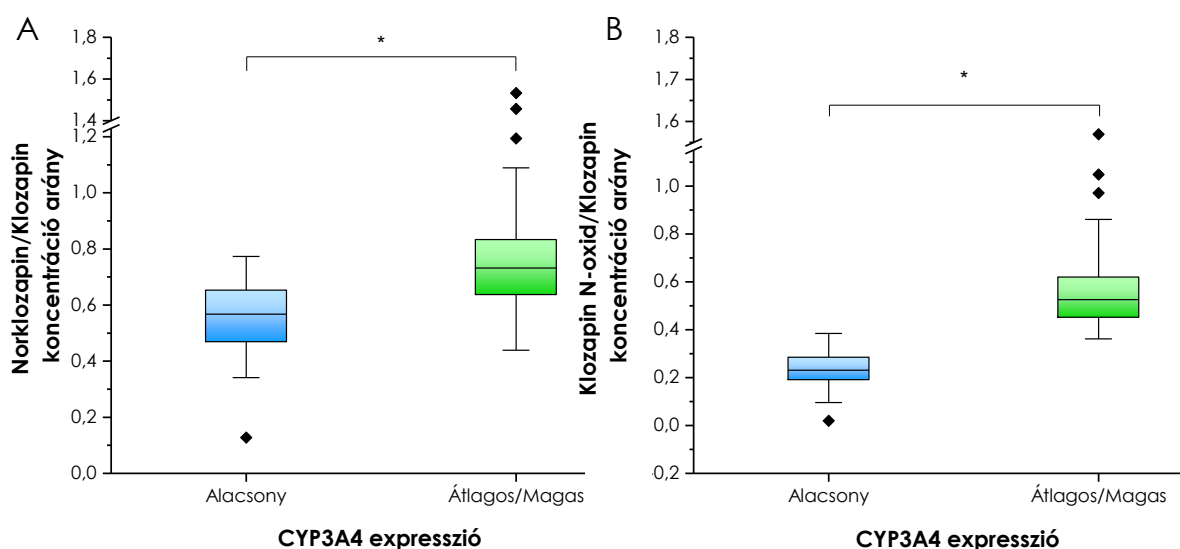


16. ÁBRA: KLOZAPIN DÓZIS-VÉRSZINT ÖSSZEFÜGGÉS ALACSONY (KÉK ROMBUSZ) ÉS ÁTLAGOS (ZÖLD ROMBUSZ) CYP3A4 EXPRESSZÁLÓ BETEGEKNÉL

oszthattuk. A CYP3A5*3/*3 genotípusú alacsony CYP3A4 expresszióval rendelkező betegeknek közel kétszer akkora vérszintet mértünk, mint a többi csoportnál (15.

ábra). Így a klorzapin koncentrációk és a CYP3A4 expresszió kapcsolatának modellezéséhez összevontuk azokat a csoportokat, amelyek normalizált klorzapin szintjei között nem mutatkozott szignifikáns eltérés. A két csoport modellezéséhez a már ismert matematikai összefüggést használtuk (4.9 fejezet), ami szintén alkalmasnak bizonyult a klorzapin vérszintek és a CYP3A4-status összefüggésének becslésére, a standard deviáció 15,68 ng/ml volt az alacsony CYP3A4 expressziós csoportban és 6,65 ng/ml volt az összes többi csoportban (16. ábra).

Annak megerősítésére, hogy melyik CYP enzim meghatározó a metabolitok keletkezésében, összevettük a CYP1A2 és a CYP3A4 mRNS szinteket a metabolit/klorzapin arányokkal. Mindkét metabolit vérszintje széles tartományban változott (norklorzapin: 16-894 ng/ml, klorzapin N-oxid: 0-383 ng/ml). Annak ellenére, hogy az irodalom egyaránt lehetségesnek tartja a CYP1A2 és a CYP3A4 szerepét a norklorzapin képződésében, betegeinknél csak a CYP3A4 mRNS szintek és a norklorzapin/klorzapin vérszint arányok között találtunk összefüggést. A CYP3A4-et alacsonyan expresszálóknál kisebb norklorzapin/klorzapin arányt találtunk, mint az átlagos/magas CYP3A4 expressziós kategóriába soroltaknál



17. ÁBRA: A CYP3A4 EXPRESSZIÓ HATÁSA A KLOZAPIN N-OXID/KLOZAPIN KONCENTRÁCIÓ ARÁNYRA (A) ÉS A NORKLOZAPIN/KLOZAPIN KONCENTRÁCIÓ ARÁNYRA (B)

* $P < 0,0001$ (A DOBOZ DIAGRAMOKON A MEDIÁN, AZ ALSÓ ÉS FELSŐ KVARTILISEK, ILLETVE A MINIMUM-MAXIMUM SZEREPELNEK, A PONTOK AZ OUTLIEREKET JELÖLİK)

($0,5521 \pm 0,1535$ vs $0,7655 \pm 0,2088$, $P < 0,0001$) (17. ábra (A)). A norklorzapin/klorzapin vérszint arányok viszont megegyeztek a CYP1A2-t alacsonyan, illetve átlagos szinten expresszálóknál ($0,6988 \pm 0,2341$ vs $0,7070 \pm 0,1824$, $P = 0,3966$).

A klozapin N-oxid keletkezéséért felelősnek tartott CYP3A4 szerepét vizsgálati eredményeink is alátámasztották. A CYP3A4 átlagos expressziójú csoportban több mint duplája volt a klozapin N-oxid/klozapin vérszint arány, mint az alacsony szintekkel rendelkezőknél ($0,2279 \pm 0,0887$ vs $0,5659 \pm 0,1960$, $P < 0,0001$) (17. ábra (B)).

A CYP3A4 expresszió és a klozapin vérszintek, valamint a metabolit/klozapin arányok közötti szoros összefüggés megerősíti a CYP3A4 szerepét a klozapin metabolizmusában, különösen hogy betegeink nagy hányadánál a CYP1A2 alacsony szinten expresszáldott.

5.2.3 Valproát

A CYP2C9-status és a valproát kezelés összefüggéseinek vizsgálatába 50 olyan epilepsziás gyermeket (<15 év) vontunk be, akiknél a betegség újonnan került diagnosztizálásra és a tervezett antiepileptikus kezelés valproát monoterápia volt. Az 50 beteg mindegyike rendelkezett legalább egy működőképes CYP2C9 alléllal, és 70 %-uk volt CYP2C9*1/*1 homozigóta vad genotípusú. A heterozigóta genotípusú betegek CYP2C9*1/*2-t vagy CYP2C9*1/*3-t hordoztak. A gyerekek CYP2C9*2 és CYP2C9*3 allélgyakoriságai (0,09 és 0,06) az európai fehér populációra jellemző értékeket mutatták (lásd: 3. táblázat). A betegek 46 %-a átlagos CYP2C9 expressziót, 54 %-uk pedig alacsony CYP2C9 expressziót mutatott (13. táblázat).

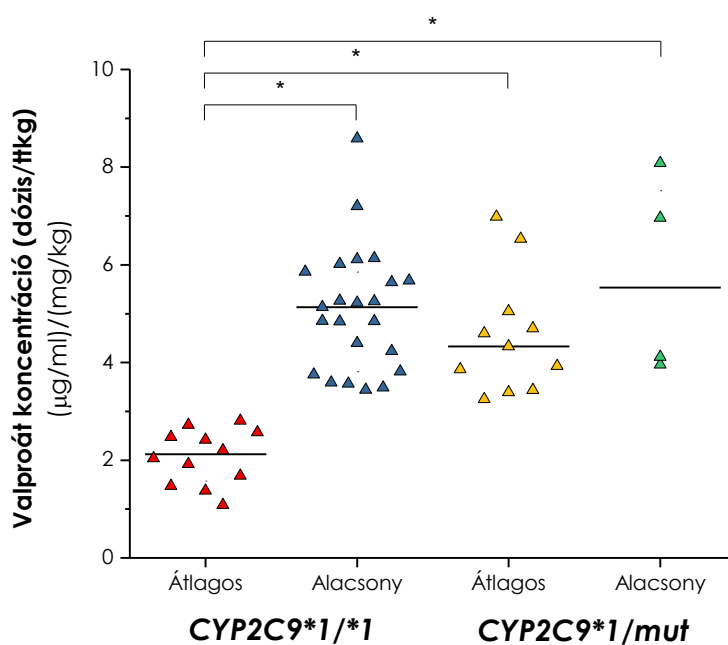
13. TÁBLÁZAT: EPILEPSZIÁBAN SZENVEDŐ GYERMEKEK DEMOGRÁFIAI ADATAI ÉS CYP2C9-STATUSA

CYP2C9-status	N	Kor (év)[#]	Testtömeg (kg)[#]	Fiúk/lányok
<i>CYP2C9*1/*1</i>				
átlagos expresszálók	12	4 (0,5-15)	25 (6-60)	4/8
alacsony expresszálók	23	7 (1,5-15)	27 (14-65)	10/13
<i>CYP2C9*1/mut</i>				
átlagos expresszálók	11	4 (3-14)	19 (14-52)	5/6
alacsony expresszálók	4	7,5 (4-15)	22,5 (15-60)	1/3
Összes	50	6,75 (0,5-15)	21,5 (6-65)	20/30

[#]medián (min-max), CYP2C9*1/mut: CYP2C9*1/*2 vagy CYP2C9*1/*3

Magas CYP2C9 expressziót egyik gyermeknél sem mértünk. A CYP2C9-status alapján két csoportba soroltuk a betegeket aszerint, hogy milyen genotípussal rendelkeztek (*CYP2C9*1/*1* és *CYP2C9*1/mut*), majd azokon belül két-két alcsoportot hoztunk létre a CYP2C9 expresszió alapján (átlagos és alacsony expresszálók) (13. táblázat). A homozigóta vad genotípusú gyermekek mindössze egy harmada rendelkezett átlagos CYP2C9 expresszióval. A két működőképes allélt hordozó egyéneket általában extenzív metabolizálónak tekintik, ugyanakkor betegeink döntő többsége (65 %) alacsony expresszálónak bizonyult. A heterozigóta genotípusú gyermekeknél is egyaránt találtunk átlagos (N=11) és alacsony (N=4) CYP2C9 expressziós szintekkel rendelkezőket.

Összefüggést találtunk a normalizált valproát koncentrációk és a betegek CYP2C9-statusa között. A *CYP2C9*1/*1* homozigóta vad genotípusú és átlagos expressziós szintekkel rendelkező gyermekeknek fele akkora normalizált valproát vérszintjei voltak (2,12 $\mu\text{g/ml}/(\text{mg/kg})$), mint az alacsony CYP2C9 expressziójú betegeknek (5,13 $\mu\text{g/ml}/(\text{mg/kg})$), vagy a (*CYP2C9*1/*2* és *CYP2C9*1/*3*) heterozigóta genotípusú csoportba tartozó, átlagos (4,33 $\mu\text{g/ml}/(\text{mg/kg})$) és alacsony expresszálóknak (5,54 $\mu\text{g/ml}/(\text{mg/kg})$) (18. ábra).



18. ÁBRA: A CYP2C9-STATUS HATÁSA A GYERMEKEK NORMALIZÁLT VALPROÁT KONCENTRÁCIÓIRA *P<0,0001 (— A MEDIÁNT JELÖLI)

5.2.4 A terápiás vérszint kialakulásához szükséges dózisok becslése

Miután feltérképeztük, hogy az egyes hatóanyagok lebontásában mely CYP izoformáknak van elsődleges szerepe, és a klinikai vizsgálatok során igazoltuk, hogy ténylegesen mely enzimek vesznek részt a vérszintek kialakításában, azt is megvizsgáltuk, hogy a terápiás vérszint kialakításához mekkora dózis szükséges az adott gyógyszer-metabolizáló képességgel rendelkező páciensek esetén.

5.2.4.1 Pszichiátriai betegeknél alkalmazott klonazepam és klozapin dózisának becslése

A klinikai gyakorlatban a szkizofrén páciensek szorongásának kezelésére a klonazepam optimális terápiás tartománya 20-70 ng/ml közötti, míg az antipszichotikum klozapin terápiás ablakának a 350-600 ng/ml koncentrációtartományt javasolják (Hiemke et al, 2011). A klozapin esetében ugyanakkor többen bizonyították, hogy alacsonyabb szérumszintek (200-300 ng/ml) ugyanolyan hatásosak, mint a magasabb tartomány (300-450 ng/ml) (Ulrich *et al.* 2003; Yusufi *et al.* 2007). A fentieket figyelembe véve, alsó küszöbértéknek a 200 ng/ml-es klozapin koncentrációt tekintettük.

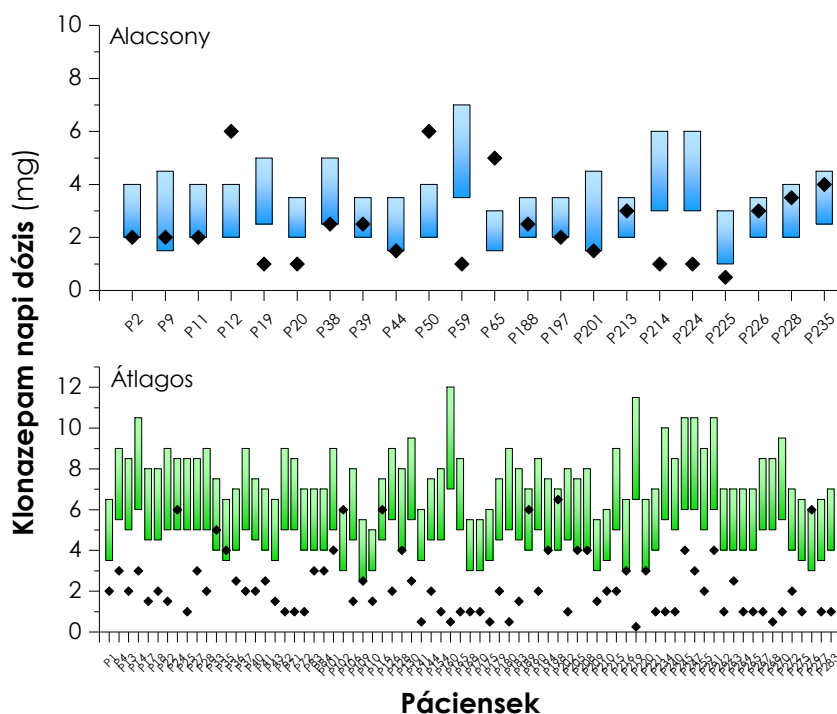
A klonazepam és a klozapin dózis-vérszint összefüggésének becslésére alkotott modelleket alkalmaztuk az optimális dózis javaslatok kidolgozásához is (4.9 fejezet, 3. egyenlet). A modellek szerint szignifikánsan magasabb napi dózis szükséges a CYP3A4-et átlagos szinten expresszálóknak, mint az alacsony expressziós szintekkel rendelkezőknek mind a klonazepam (4,47–7,84 mg vs 2,23–4,22 mg, $P < 0,0001$), mind a klozapin esetében (227,39–586,38 mg vs 51,04–258,33 mg, $P < 0,0001$). Ugyanakkor a klinikai gyakorlatban alkalmazott dozírozás nagyjából megegyezett az egyes expressziós csoportoknál. (14. táblázat).

14. TÁBLÁZAT: A KLINIKAI GYAKORLATBAN ALKALMAZOTT DÓZISOK A KÜLÖNBÖZŐ EXPRESSZIÓS CSOPORTOKNÁL

	Klonazepam		Klozapin	
	CYP3A4 alacsony exp.	CYP3A4 átlagos exp.	CYP3A4 alacsony exp.	CYP3A4 átlagos exp.
Klinikai gyakorlat (napi dózis)#	2,28 ± 1,56 mg	2,47 ± 1,58 mg	245,37±158,88 mg	208,98±120,69 mg
	P=0,5237		P=0,4166	

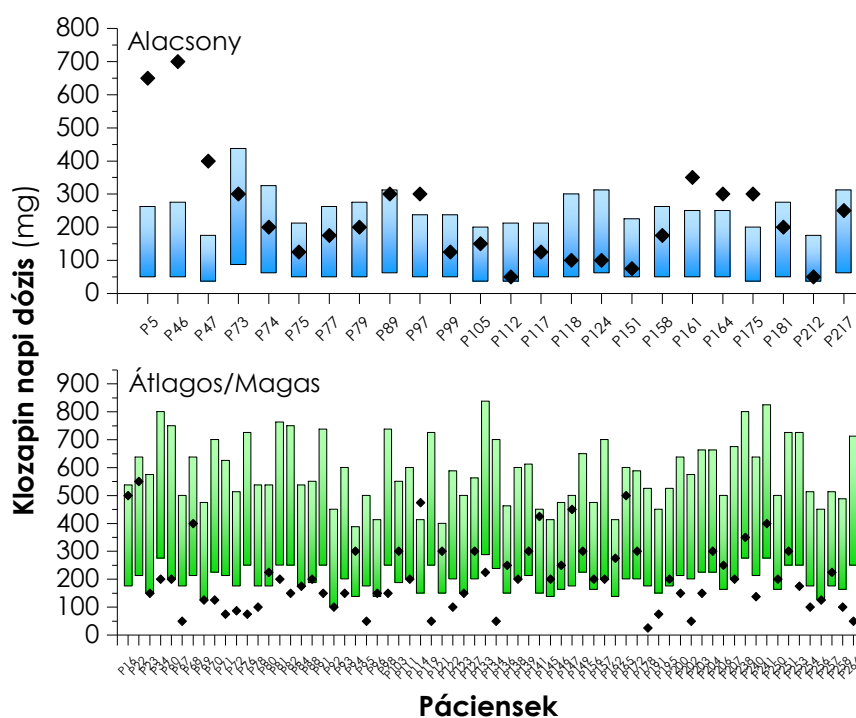
#átlag±SD

A matematikai modellek alapján a klonazepammal kezelt betegek közel 70 %-ánál, a klozapinnal kezelteknek pedig nagyjából a felénél hibás dozírozást figyeltünk meg, mely főleg az átlagos CYP3A4 expressziójú csoportokban jelentkezett, és szinte kivétel nélkül alul dozírozásban nyilvánult meg. A rutinszerűen alkalmazott dozírozás általában megfelelőbbnek tűnik a CYP3A4-et alacsonyan expresszálók esetében. E csoportban a betegek 60 %-ánál alkalmaztak olyan klonazepam dózist, amely terápiás vérszintet eredményezett, a 22 páciensből 3-an voltak túl dozírozva, 6 páciens kapott a szükségesnél alacsonyabb dózist.



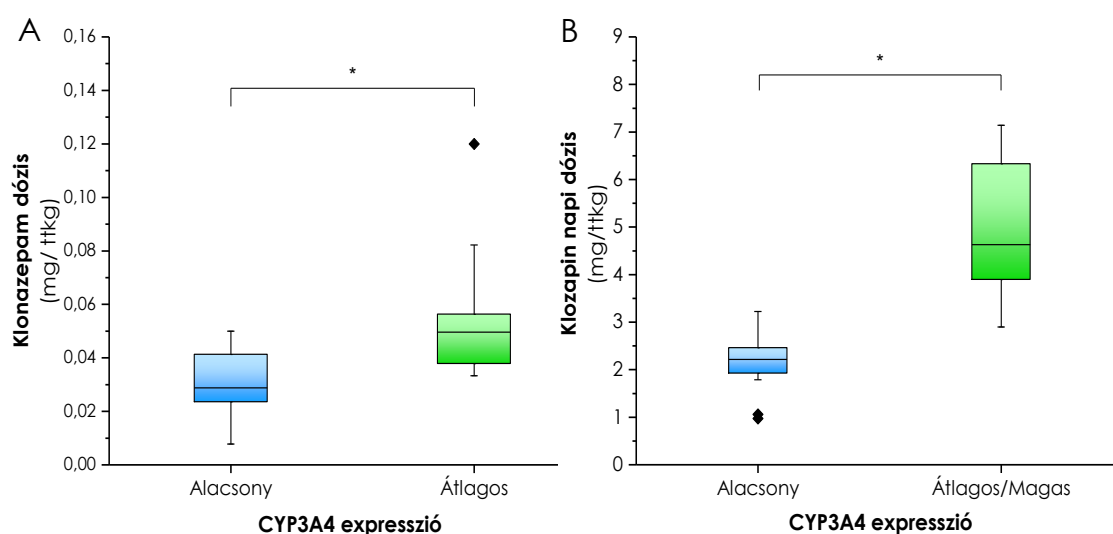
19. ÁBRA: A KLONAZEPAM TERÁPIÁS KONCENTRÁCIÓJÁHOZ SZÜKSÉGES DÓZISTARTOMÁNYOK (DOBOZ DIAGRAM) ÉS A TÉNYLEGESEN ALKALMAZOTT DÓZISOK (PONTOK) A CYP3A4-ET ALACSONY ÉS ÁTLAGOS SZINTEN EXPRESSZÁLÓKNÁL

Az átlagos CYP3A4 expressziójú csoportban alkalmazott adagok mindössze 15 páciens esetén voltak megfelelőek a modell alapján becsült dózistartomány alapján, ugyanakkor a csoport 25 tagjánál a terápiás tartományba eső vérszintet mutathattunk ki (19. ábra).



20. ÁBRA: A KLOZAPIN TERÁPIÁS KONCENTRÁCIÓJÁHOZ SZÜKSÉGES DÓZISTARTOMÁNYOK (DOBOZ DIAGRAM) ÉS A TÉNYLEGESEN ALKALMAZOTT DÓZISOK (PONTOK) A CYP3A4-ET ALACSONY ÉS ÁTLAGOS SZINTEN EXPRESSZÁLÓKNÁL

A klozapin terápián levő, CYP3A4 alacsony expresszálók 71 %-ánál alkalmaztak olyan dózist, amely a terápiás hatáshoz szükséges vérszint kialakulását eredményezi; heten viszont túldozírozottak voltak. Az átlagos/magas CYP3A4 expresszióval rendelkező 68 beteg közül 40 beteg vérszintje volt a terápiás tartományon belül, a többiek a szükségesnél alacsonyabb dózisokat kaptak (20. ábra).



21. ÁBRA: A TERÁPIÁS HATÁSHOZ SZÜKSÉGES VÉRSZINTTEL RENDELKEZŐ PSZICHIÁTRIAI PÁCIENSEK NAPI KLONAZEPAM (A) ÉS KLOZAPIN (B) DÓZISA A CYP3A4 METABOLIZÁLÓ KÉPESSÉG ALAPJÁN (A DOBOZ DIAGRAMOKON A MEDIÁN, AZ ALSÓ ÉS FELSŐ KVARTILISEK, ÉS A MINIMUM-MAXIMUM SZEREPELNEK, A PONTOK AZ OUTLIEREKET JELÖLIK)

Alkalmaztunk egy másik megközelítést is a terápiás vérszint eléréséhez szükséges dózis-igény meghatározására. Azon páciensek napi dózisaiból vontunk le következtetéseket, akik vérszintje a terápiás tartományba esett (21. ábra (A és B)).

A CYP3A4-et alacsonyan expresszálóknál közel fele akkora klonazepam, illetve klozapin dózusra volt szükség a terápiás koncentráció eléréséhez, mint a CYP3A4-et átlagos szinten expresszálóknál (15. táblázat).

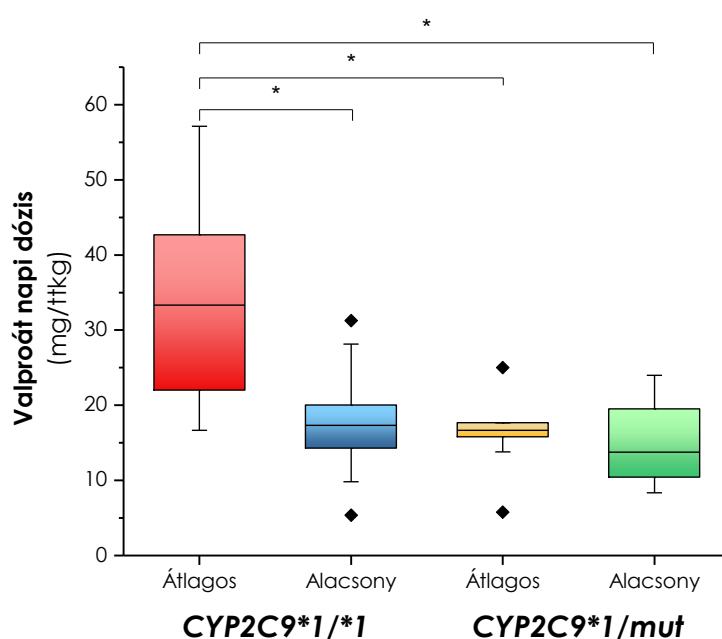
15. TÁBLÁZAT: A KÜLÖNBÖZŐ CYP3A4 EXPRESSZIÓVAL RENDELKEZŐ CSOPORTOK DÓZIS IGÉNYE

	Klonazepam		Klozapin	
	CYP3A4 alacsony exp.	CYP3A4 átlagos exp.	CYP3A4 alacsony exp.	CYP3A4 átlagos exp.
Dózis igény [#]	0,029±0,011 mg/kg	0,058±0,024 mg/kg	2,18±0,64 mg/kg	4,98±1,40 mg/kg

[#]átlag±SD

5.2.4.2 Epilepsziás gyerekeknél alkalmazott valproát dózis becslése

A klinikai gyakorlatban az epilepszia tüneti kezelésére a 40 és 100 µg/ml közötti valproát koncentráció tekinthető optimálisnak (Guerrini 2006). A CYP2C9-et alacsonyan expresszálók és/vagy CYP2C9 heterozigóta genotípussal (CYP2C9*1/*2 vagy CYP2C9*1/*3) rendelkezők jelentősen kisebb dózist igényeltek a terápiás koncentráció eléréséhez, mint az átlagos CYP2C9 expressziójú, két vad típusú allélt hordozó társaik (22. ábra).



22. ÁBRA: A KÜLÖNBÖZŐ CYP2C9-STATUSSAL RENDELKEZŐ EPILEPSZIÁS GYERMEKEK NAPI VALPROÁT DÓZIS IGÉNYE *P<0,0001 (A DOBOZ DIAGRAMOKON A MEDIÁN, AZ ALSÓ ÉS FELSŐ KVARTILISEK, ÉS A MINIMUM-MAXIMUM SZEREPELNEK, A PONTOK AZ OUTLIEREKET JELÖLIK)

A rutin klinikai gyakorlatban alkalmazott céldózis (30-40 mg/kg) ez utóbbi csoport kezelésére (a vizsgálatban szereplő gyermekek 24 %-a) tűnik megfelelőnek. Minden más esetben 20 mg/ttkg-nál alacsonyabb dózis alkalmazásával érhető el a terápiás vérkoncentráció. A homozigóta vad genotípusú, de alacsony CYP2C9 expressziójú pácienseknek 17,8 mg/ttkg, a heterozigóta átlagos expresszálóknak 16,7 mg/ttkg és a heterozigóta de alacsony expresszálóknak a 13,8 mg/kg dózist találtuk megfelelőnek az ideális terápiás koncentráció eléréséhez (22. ábra). Kizárólag a CYP2C9 genotípus alapján beállított terápia szerint a betegeink mintegy 30 %-a igényelne csökkentett dózist (CYP2C9*1/mut), viszont a fenokonverzióknak köszönhetően ez az igény 76 %-ra emelkedik. Tehát úgy tűnik, hogy a homozigóta vad genotípusú (CYP2C9*1/*1), alacsony expresszáló páciensek hasonló valproát metabolizáló képességgel rendelkeznek, mint a polimorf allélt

hordozó betegek (*CYP2C9*1/*2* vagy *CYP2C9*1/*3*). Következésképpen a két vadttípusú alléllal rendelkező betegek esetén a valproát vérszint kialakulásában a CYP2C9 expresszió a meghatározó, míg a polimorf allélt hordozó pácienseket a CYP2C9 expressziótól függetlenül, gyenge metabolizáló képesség jellemzi.

5.2.5 Valproát kezelés CYP2C9-status alapján

Végezetül 99 pediátriai páciens bevonásával vizsgáltuk, hogy milyen klinikai előnye lehet a CYP2C9-status alapján beállított valproát terápiának a konvencionális kezeléssel szemben. A CYPtestTM csoportból (N=52) egy *CYP2C9*2/*2* homozigóta mutáns genotípusú gyermeket kizártunk, és nem részesült valproát terápiában. A többiek (N=51) legalább egy vad típusú CYP2C9 allélt hordoztak, a páciensek negyede rendelkezett valamelyik mutáns (*CYP2C9*2* vagy *CYP2C9*3*) alléllal (16. táblázat). A homozigóta vad genotípusú (*CYP2C9*1/*1*) gyermekek kétharmada alacsony CYP2C9 expresszióval rendelkezett. A heterozigóta genotípusú gyermekek közel 70 %-a átlagos szinten fejezte ki a CYP2C9 enzimet, ugyanakkor genotípusuk alapján gyenge CYP2C9 metabolizmusra számíthatunk. Tehát az 51 gyermekből 38-nál volt várható gyenge valproát metabolizmus (16. táblázat).

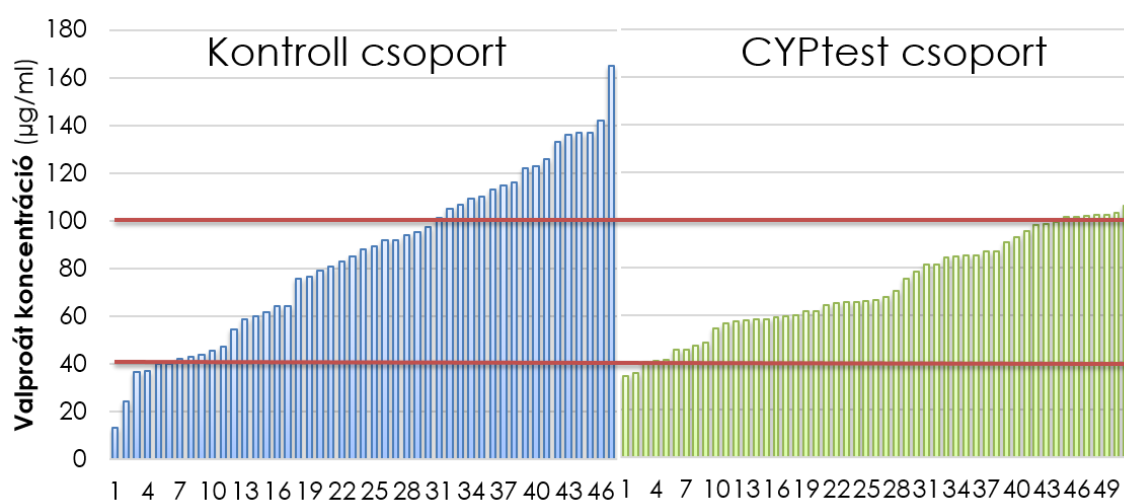
16. TÁBLÁZAT: A BETEGEK DEMOGRÁFIAI ADATAI ÉS CYP2C9-STATUSUK

Páciensek	N	Kor (év)[#]	Testsúly (kg)[#]	Nem (fiúk/lányok)
Kontroll csoport	47	8 (0,13-15)	27 (4,6-62)	31/16
CYPtest TM csoport	52	6,25 (0,5-15)	21 (6-67,5)	24/28
<i>CYP2C9*1/*1</i>				
átlagos expresszáló	12	4 (0,5-11)	15 (6-32)	4/8
alacsony expresszáló	25	7 (0,6-15)	25 (7-67,5)	12/13
magas expresszáló	1	4,5	15	1/-
<i>CYP2C9*1/mut</i>				
átlagos expresszáló	9	4 (3-15)	19 (14,5-52)	5/4
alacsony expresszáló	4	7,5 (4-15)	22,5 (15-60)	1/3
<i>CYP2C9*2/*2</i>	1	7	25	1/-

[#]medián (min-max), *CYP2C9*1/mut: CYP2C9*1/*2 vagy CYP2C9*1/*3

A CYPtest™ csoport (N=52) antikonvulzáns kezelése a CYP2C9-status alapján történt. Ha a gyermek mindkét szülőjétől polimorf allélt örökölt, a valproát terápia nem javasolható, alternatív hatóanyag alkalmazása szükséges. Egy vagy két vad típusú allélt hordozó betegek esetén a valproát kezelés a CYP2C9-status alapján került beállításra. *CYP2C9**1/*1 homozigóta vad genotípusú, átlagos *CYP2C9* expresszióval rendelkező páciensek (23,5 %) átlagos dózist (30-40 mg/kg) kaptak, heterozigóta (*CYP2C9**1/*2 vagy *CYP2C9**1/*3) genotípusú vagy alacsony *CYP2C9* expressziójú betegek (74,5 %) csökkentett dózist (10-20 mg/kg), míg a magas *CYP2C9* expresszióval rendelkező, *CYP2C9**1/*1 genotípusú gyermek emelt dózissal (>40 mg/kg) kezelésben részesült. A kontroll csoportban (N=47) a valproát kezelés a klinikai gyakorlatban szokásos módon, a páciensek testtömegéhez viszonyítva történt (20-40 mg/kg), melyet a mellékhatások jelentkezése illetve hatástalanság esetén módosítottak (Guerrini 2006).

Annak ellenére, hogy a CYPtest csoportban levő gyermekek többsége csökkentett dózissal valproát kezelést kapott, a terápiás hatás (rohamok gyakorisága) hasonlóan alakult, mint a konvencionális kezelésben részesülő csoport esetében. Nem volt szignifikáns különbség a valproát vérszintek alakulásában sem, viszont jelentősen kevesebb betegnél tapasztaltunk a terápiás tartományon kívül eső vérszintet a CYPtest csoportban (9/51 vs. 21/47), valamint lényegesen alacsonyabb volt a terápiás tartománytól való eltérés is (23. ábra)(17. táblázat).



23. ÁBRA: VALPROÁT VÉRSZINTEK 1 HÓNAPPAL A TERÁPIA KEZDETE UTÁN, A BORDÓ VONALAK A TERÁPIÁS TARTOMÁNYT JELZIK

Az esetleges mellékhatások korai felismerésére a betegek biokémiai és hematológiai paramétereit mindkét csoportban követtük a terápia kezdetétől. A

kezelés előtt a májfunkciós paraméterek, a kalcium és foszfor szintek, a vörösvértestek, fehérvérsejtek és vérlemezkék száma a referencia tartományon belül volt az összes gyermeknél, és egy hónappal a kezelés kezdete után sem változtak számottevően a két csoportnál. Viszont lényegesen magasabb ALP szintek (17. táblázat) jelentkeztek a konvencionális kezelés alatt álló betegeknél, ami jelezhet hepatotoxicitást vagy csontanyagcsere-zavart is. A szérumban lévő ALP szintek a gyermekek korától függően nagyon különbözőek lehetnek (Shaw *et al.* 2014), de az egy hónap elteltével megfigyelt, szembeötlően emelkedett koncentrációk inkább a valproát kezelésnek tulajdoníthatóak, mintsem átmeneti hiperfoszfatémiának. A gyermekek koreloszlása mindkét csoportban hasonló volt, mégis a kontroll csoportban levő gyermekek közel felének, míg a CYPtest csoport alig 4 %-ának esett az ALP szintje a referenciatartományon kívül (17. táblázat).

17. TÁBLÁZAT: A BETEGEK KLINIKAI ADATAI 1 HÓNAPPAL A VALPROÁT TERÁPIA KEZDETE UTÁN

Paraméter	Kontroll csoport [#]	CYPtest csoport [#]	Szignifikancia
Valproát koncentráció (µg/ml)	85,0±36,02	72,0±21,05	ns
Terápiás tartományon kívül eső betegek száma	21/47	9/51	P=0,004
Eltérés a terápiás tartománytól (µg/ml)	21,2±16,17	2,98±1,90	P<0,001
ALP (U/l)	545,1±235,81	236,0±138,76	P<0,001
ALP ref. tartományon kívül eső betegek száma	23/47	2/51	P<0,001
GOT (U/l)	27,3±9,77	27,5±8,66	ns
GPT (U/l)	16,1±7,93	15,8±8,50	ns
GGT (U/l)	15,6±7,02	14,3±8,51	ns
Kalcium (mmol/l)	2,23±0,434	2,41±0,121	ns
Foszfor (mmol/l)	1,64±0,533	1,52±0,297	ns
VVT szám (x 10 ¹² /l)	4,5±0,48	4,6±0,46	ns
FVS szám (x 10 ⁹ /l)	7,0±2,19	7,9±3,22	ns
Vérlemezke szám (x 10 ¹² /l)	227,1±88,06	245,4±70,81	ns

[#]átlag±SD, ns: nem szignifikáns

(ALP - Alkalikus foszfatáz, GOT - Glutamát-oxálacetát transzamináz, GPT - Glutamát-piruvát transzamináz, , GGT - Gamma-glutamil transzferáz, VVT – vörövérttest, FVS – fehérvérsejt)

A kontroll csoportban gyakrabban figyelhattunk meg valproát indukálta súlyos mellékhatásokat, mint a CYP2C9-status alapján kezelt betegeknél (14/47 vs. 2/51, P< 0,001). A legtöbb esetben (17 %) hiperammonémia (> 50 µmol/l) fordult elő, ami mindig magas ALP szintekkel (>750 U/l, sőt >1200 U/l), és egyéb mellékhatásokkal, mint álmoság, fáradtság vagy viselkedési zavarok, is társult. Magas ammónia szintekkel rendelkező páciensek valproát koncentrációja is magasabb volt, mint 100 µg/ml. Az enyhe mellékhatások előfordulása (súlygyarapodás, hajhullás) viszont nem mutatott statisztikailag szignifikáns különbséget a két csoportban (18/47 vs 10/51, P=0,05)(18. táblázat).

18. TÁBLÁZAT: A MELLÉKHATÁSOK ELŐFORDULÁSA 1 HÓNAPOS VALPROÁT TERÁPIÁT KÖVETŐEN

Mellékhatások	Kontroll csoport	CYPtest csoport	Szignifikancia
Súlyos	14/47	2/51	P<0,001
Hiperammonémia	8/47	1/51	P=0,01
Hányinger	1/47	1/51	ns
Trombocitopénia	2/47	0/51	ns
Bőrkiütések	1/47	0/51	ns
Zavartság, eszméletvesztés	2/47	0/51	ns
Enyhe	18/47	10/51	p=0,05
Hajhullás	3/47	2/51	ns
Álmosság	6/47	4/51	ns
Enuresis	2/47	1/51	ns
Fáradtság	3/47	1/51	ns
Étvágy változás, súlygyarapodás	3/47	2/51	ns
Hangulatingadozás	1/47	0/51	ns

ns: nem szignifikáns

6 DISZKUSSZIÓ

A gyógyszer-metabolizáló képesség nagy mértékben befolyásolhatja a betegek gyógyszerekre adott válaszreakcióját és a mellékhatások megjelenését. Az eltérő metabolizáló fenotípust kialakító genetikai és nem-genetikai tényezők számottevő inter-individuális különbségeket okozhatnak a gyógyszerválaszban (Ingelman-Sundberg 2001). Az egyedi különbségeket felismerve, a személyre szabott terápia segíthet elkerülni a gyógyszerhatás elmaradását vagy a mellékhatások fokozott megjelenését (Wilke *et al.* 2005). A genotipizálás során a működésképtelen enzimet eredményező allélok azonosításával meghatározható a gyenge gyógyszerlebontó képesség, ugyanakkor nem szolgáltat megbízható információt a mutációval nem rendelkező egyének metabolikus kapacitásáról. Nem-genetikai tényezők, mint a kor, betegségek, táplálkozás vagy a gyógyszeres kezelés átmenetileg módosíthatják a páciensek gyógyszer-metabolizáló képességét (Shah és Smith 2015). A gyermekek (<16 év) vagy az idősek (>60-65 év) farmakokinetikai különbségeik miatt eltérően reagálhatnak a gyógyszerekre, mint a fiatal vagy középkorú felnőttek. Újszülöttekben a felszívódás csökkent mértékű, a permeabilitás viszont gyermekekben nagyobb, mint felnőtteknél. Gyermekekben egyes metabolikus enzimek aktivitása kicsi és a clearance is csökkent mértékű (Lu és Rosenbaum 2014). A „Fázis 1” metabolizmus CYP függő oxidációs folyamatai alacsony aktivitást mutatnak közvetlenül a születés után, majd az egyes izoenzimek aktivitása folyamatosan növekszik. Gyermekekre általában magasabb CYP expresszió jellemző, majd pubertás kor körül csökken a felnőttre jellemző szintre (Cresteil 1998; Ginsberg *et al.* 2002). A „Fázis 2” glükuronidációs folyamatai szintén alacsonyak a születés körül, és néhány izoforma a pubertás korig nem éri el a felnőtt aktivitási szintet (Hines 2008). Ezen különbségek miatt gyermekekben egyes metabolikus útvonalak eltérő mértékben működnek, így a metabolitok is eltérő mértékben képződhetnek, mint a felnőttekben. Időskorban nemcsak a felszívódás lassabb, de csökken a máj mérete és vérátáramlása is, valamint lassulnak a „Fázis 1” oxidációs folyamatai (Tanaka 1998). Tehát időseknél alacsonyabb CYP expressziós szintek várhatóak, mint fiatal és középkorú felnőtteknél.

Habár a páciensek gyógyszer vérszintjeire nagy hatással van a gyógyszer-lebontó képességük, és nemzetközi irányelvek erősen ajánlott (klozapin) és ajánlott

(klonazepam, valproát) kategóriákba sorolják egyes hatóanyagok terápiás gyógyszer szint monitorozását (Hiemke *et al.* 2011), a klinikai gyakorlatban ennek megvalósítására azonban nem mindenhol van lehetőség.

6.1 Személyre szabott klonazepam kezelés lehetősége

A CYP3A4 enzim jelentőségét a klonazepam metabolizmusában már igazolták (Seree *et al.* 1993), a dózis beállításoknál azonban mégsem veszik figyelembe a páciensek CYP3A4 aktivitásait. Eredményeink alapján az alacsony CYP3A4 expresszió magas normalizált klonazepam vérszintet eredményez, ami különösen veszélyes lehet időskorú betegeknél. Az alacsony CYP3A4 expresszió a klonazepam felhalmozódását okozhatja, ami így a mellékhatások fokozott megjelenéséhez vezethet. Az olyan mellékhatások megjelenése, mint az álmoság, zavartság és ataxia az esetek többségében 60 ng/ml-nél magasabb vérszinteknél jelentkezik, 100 ng/ml felett pedig súlyosbodnak a toxikus hatások (Morselli és Franco-Morselli 1980). Mivel a klonazepam okozhat járás- és egyensúlyzavarokat, az elesések gyakoribbak lehetnek alacsony CYP3A4 szintekkel rendelkező betegeknél, pl. időseknél. Számos közlemény felvetette, hogy a benzodiazepin terápia a sérüléssel járó elesések kockázatát növeli idős pácienseknél (Ray *et al.* 2000; Pariente *et al.* 2008). Ray *et al.* (2000) összefüggést igazoltak a hosszú felezési idejű benzodiazepinek (pl. klonazepam) és az elesések kockázata között, Herings *et al.* (1995) pedig ugyanezt írta le a benzodiazepineket magas dózisban szedőknél. Sylvestre *et al.* (2012) egy benzodiazepin-specifikus analízist javasolt, mivel nem ugyanazok a folyamatok vezetnek elesésekhez az egyes benzodiazepineknél. Klonazepam esetében sokkal inkább a kezelés időtartamát tartják befolyásoló tényezőnek, mintsem a dózist. Kutatásunk bizonyítja, hogy az inter-individuális különbségek a klonazepam metabolizmusában becsülhetőek a betegek CYP3A4 expressziójának meghatározásával. Mivel a klonazepam clearance-e szignifikánsan magasabb a CYP3A4 átlagos metabolizálónál, mint az alacsonyan expresszálónál, ez utóbbi csoportba tartozók körülbelül fele akkora dózist igényelnek a terápiás vérszint eléréséhez, mint az átlagos expresszálók.

A 7-aminoklonazepam szérum koncentrációja általában hasonló, mint az anyavegyületé, és tekintélyes része az agyban is jelen van. Ugyan farmakológiailag inaktív vegyület, de Munakata és Tsuchiya (2008) igazolta, hogy a 7-aminoklonazepam a GABA_A receptor gyenge parciális agonistájaként módosíthatja

a klonazepam hatását. Magas 7-aminoklonazepam koncentrációk esetén versengés alakulhat ki a GABA_A receptor benzodiazepin kötőhelyeiért, leszoríthatja a klonazepamot, csökkentve annak mennyiségét. Ebből adódóan klinikai következményekkel járhat a magas 7-amino metabolit koncentráció, különösen a kezelés leállítása esetén. A klonazepam vérszintek alakulásában a fő tényező a CYP3A4 expresszió, míg a 7-aminoklonazepam vérszintjét a CYP3A4 expresszió és NAT2 acetiláló fenotípus határozza meg. A lassú acetilálás pedig egyértelműen magyarázza a 7-amino metabolit felhalmozódását. Mivel a pácienseink többsége (77,5 %) átlagos CYP3A4 expresszióval rendelkezett, és ~50 %-uknál „lassú acetiláló” fenotípust határoztunk meg, közel 40 %-uknak volt magas a 7-aminoklonazepam koncentrációja. Sjö *et al.* (1975) megvonási tüneteket tapasztaltak magas 7-aminoklonazepam szintekkel rendelkező pácienseknél. Tehát a klonazepam terápia leállításakor lassú és óvatos visszavonási protokoll követése javasolt az átlagos CYP3A4 expressziójú és lassú NAT2 acetiláló fenotípusú betegeknél, hogy a megvonási tüneteket elkerülhessük, vagy legalább csökkenthessük a súlyosságukat. Nardi *et al.* (2010) 0,25 mg/hét dóziscsökkentést javasol egy átlagos időtartamú klonazepam kezelés után, azonban a terápia egyénre szabott leállításának előnyeit érdemes lenne vizsgálni.

6.2 A klopabin kezelés személyre szabásának lehetőségei

Számos páciens-függő faktort (nem, kor, dohányzás) hoztak már kapcsolatba a klopabin eliminációjával, de ezek jelentősége tanulmányról tanulmányra változik, és gyakran függ a vérszint adatok normalizációjától is (Haring *et al.* 1989; Tang *et al.* 2007). Több CYP enzim szerepét vizsgálták, de klinikai jelentősége egyiknek sem tisztázott kellőképpen. cDNS expresszált CYP enzimekkel végzett *in vitro* vizsgálatok a CYP1A2, a CYP2C19, a CYP2D6 és a CYP3A4 potenciális szerepét jelezték (Linnet és Olesen 1997; Olesen és Linnet 2001), de a CYP2C19 és a CYP2D6 szerepét a mikroszómális vizsgálatok kevésbé támasztották alá (Fang *et al.* 1998). Saját eredményeink szerint sem valószínű e két CYP enzim meghatározó szerepe a klopabin eliminációjában. Mindez összhangban van azzal, hogy a páciensek klopabin kezelésre adott válaszát a CYP2D6 genotípusuktól függetlennek találták (Arranz *et al.* 1995), másrészt a klopabin clearance-ben mutatkozó óriási különbségeket a polimorf CYP2C19 és CYP2D6 enzimekkel nem sikerült

alátámasztani (Dahl *et al.* (1994). Ugyanakkor Jaquenoud Sirot *et al.* (2009) magasabb klozapin vérszinteket talált a *CYP2C19*2/*2* homozigóta mutáns genotípusú pácienseknél, mint a mutációt nem, vagy csak heterozigóta formában hordozó társaiknál. Ennek egy lehetséges magyarázata az lehet, hogy a betegek normalizált vérszintjeinek kalkulálásánál nem vették figyelembe a testtömeget, ami módosíthatja az adatokat és az értékelést.

A CYP1A2 tekinthető az egyik fő enzimek a klozapin lebontásában (Olesen és Linnet 2001), amit indirekt klinikai bizonyítékokkal igyekeztek alátámasztani. Miszerint a dohányzás okozta CYP1A2 indukció megnövekedett dózis-igényt okozott a dohányos férfiaknál (Haring *et al.* 1989; Tang *et al.* 2007), bár a fokozott indukciót okozó *CYP1A2*1F* alléllal rendelkezők nem igényelték dózis-változtatást (van der Weide *et al.* 2003). Másfelől Ferrari *et al.* (2012) összefüggést találtak a klozapin indukálta mellékhatások megjelenése és az alacsony aktivitást okozó *CYP1A2*1C* allél megléte között. A klozapin terápia mellett adott fluvoxamin kezelés megemelte a klozapin vérszintjét, amit a fluvoxamin CYP1A2 gátló hatásával magyaráztak (Szegedi *et al.* 1999; Lu *et al.* 2004). Ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy a fluvoxamin nem szelektív CYP1A2 inhibitor, gátolja a CYP2D6 és CYP3A4 aktivitásokat is (Kashuba *et al.* 1998).

Eredményeink nem támasztják alá a CYP1A2 domináns szerepét, inkább a páciensek CYP3A-statusa és nem a CYP1A2 expresszió befolyásolta a klozapin szinteket. Az alacsony CYP1A2 aktivitással rendelkező betegeknél nagyobb szerep juthat a CYP3A4-nek, mint azt korábban gondolták (Olesen és Linnet 2001). Hasonló következtetésre jutott Chetty és Murray (2007) is, és további kutatásokat javasoltak a klozapin eliminációjában mutatkozó egyéni különbségek magyarázatára egyéb CYP enzimek részvételével.

A CYP3A4 döntő szerepéről több indirekt bizonyíték is rendelkezésünkre áll. Egyfelől Ghassabian *et al.* (2010) összefüggést találtak a norklozapin képződés és a CYP3A4 szelektív szubsztrát midazolam clearance-e között; másrészt CYP3A4 induktorok (karbamazepin, rifampicin vagy fenitoin) egyidejű adása lényegesen csökkenti a klozapin vérszintet (Parker 2016); harmadrészt a CYP3A4 inhibitor eritromicin kezelésre nő a klozapin szint és toxikus tünetek jelentkeznek (Cohen *et al.* 1996). Továbbá Zhang *et al.* (2008) bizonyították a CYP1A2 és a CYP3A4 funkcionális szerepét a klozapin clearance-ében, és felvetették, hogy a CYP3A4 és a CYP1A2 relatív aktivitásai határozhatják meg a metabolizmus útvonalát. Bár a

szkizofrén betegek többsége általában dohányzik (de Leon és Diaz 2005), ami az indukció miatt magas CYP1A2 aktivitást idéz elő, a betegeink mindössze 38 %-a dohányzott, és 4-en voltak erős dohányosok (> 20 szál/nap). A pácienseink több, mint 70 %-a alacsony CYP1A2 expresszióval rendelkezett, ugyanakkor nagyjából ugyanennyien rendelkeztek CYP3A4 átlagos/magas expresszióval. Három alacsony CYP3A4 expressziójú páciens is ez utóbbi kategóriába került, ugyanis a *CYP3A5*1* allél miatt átlagos klozapin metabolizáló kapacitást mutattak. Ebből adódóan a relatív CYP aktivitások alapján a CYP3A4/5 domináns szerepe becsülhető a klozapin eliminációjában, melyet megerősít az alacsony CYP3A4 expresszálók közel kétszeres normalizált klozapin szintje, és fele akkora dózis-igénye is.

A páciensek közel fele alul dozírozott volt, és a klozapin gyors kiürülése miatt alacsonyabb vérszintekkel rendelkezett, mint ami az optimális terápiás hatáshoz szükséges. Ráadásul az átlagos/magas CYP3A4 aktivitás megnövekedett metabolit koncentrációt okozott. A norklozapin és a klozapin N-oxid koncentrációja közel ugyanakkora volt, egyes esetekben meg is haladta a klozapinét. Míg az N-oxidáció a vegyület hatástalanságát okozza, az N-demetilációval képződő termék farmakológiai hatást mutat, mely hozzájárulhat a klozapin általános hatékonyságához (Wenthur és Lindsley 2013). Másrészt kapcsolatot találtak a magas norklozapin szintek és a súlygyarapodás, valamint az epilepsziás rohamok, mint mellékhatások fokozott megjelenése között, melyet a norklozapin erős 5-HT_{2C} antagonistá hatásának tulajdonítanak (Lu *et al.* 2004; Polcwiartek és Nielsen 2016). Ezért több szerző javasolta, hogy a klinikai hatásokat ne az abszolút klozapin koncentrációból, hanem a norklozapin/klozapin arányokból becsüljék (Weiner *et al.* 2004; Yusufi *et al.* 2007). A klozapin metabolizmusának gátlásával eredményezett alacsony norklozapin/klozapin arányok mutatnak némi klinikai előnyt (Legare *et al.* 2013).

A páciensek klozapin-metabolizáló kapacitására genetikai és számos páciens-függő tényező is hatással van. A klozapin metabolizmusában részt vevő enzimek expressziójának/aktivitásának ismerete jó lehetőséget jelenthet a klozapin szintek és a dózis-igény becslésére. Bebizonyítottuk, hogy a CYP3A-status meghatározó a klozapin vérszintek alakulásában, különösen, ha a CYP1A2 alacsony szinten fejeződik ki. A terápiás koncentráció eléréséhez kétszer nagyobb dózist igényelnek a normál CYP3A4 expresszióval, vagy *CYP3A5*1* alléllal rendelkezők, mint a

CYP3A4 alacsony expresszálók. A CYP3A-status alapján beállított gyógyszerelés megkönnyítheti az egyénre szabott klozapin terápia kialakítását.

6.3 CYP2C9-status alapú valproát terápia klinikai jelentősége

A felnőttekkel ellentétben, ahol a valproát elsősorban glükuronsavval konjugálódott formában ürül, a gyermekek esetében a CYP-függő útvonal felé tolódik a valproát metabolizmusa. Ráadásul a tartós valproát kezelés a mitokondriális β -oxidáció gátlásához is vezet, így a CYP-függő - elsősorban a CYP2C9-függő - metabolizmus előtérbe kerülhet (Fromenty és Pessayre 1995). Eredményeink tisztán mutatják az összefüggést a normalizált valproát vérszintek és a betegek CYP2C9-statusa között a 15 év alatti epilepsziás betegek esetén. A heterozigóta ($CYP2C9^{*1/*2}$ vagy $CYP2C9^{*1/*3}$) genotípusú gyermekek gyenge valproát metabolizmust mutattak, csakúgy, mint a két vad típusú alléllal, de gyenge CYP2C9 expresszióval rendelkező társaik, miközben az átlagos CYP2C9 expresszáló, $CYP2C9^{*1/*1}$ genotípusúak sokkal aktívabbnak bizonyultak a valproát lebontásában. A homozigóta vad genotípus működőképes enzimet eredményez, ezért általában extenzív metabolizáló fenotípussal társítják. A fenokonverzióhoz vezető külső és belső tényezők, mint a gyógyszeres kezelés, táplálkozás, betegségek, gyulladás, hormonális állapot módosíthatják a gyógyszer-metabolizáló enzimek expresszióját, működését. A valproát kezeléssel párhuzamosan alkalmazott, CYP2C9 induktorokkal történő gyógyszerelés (pl. fenitoin, fenobarbitál vagy karbamazepin), fokozott expressziót és megnövekedett enzimaktivitást eredményez a kombinált terápiában részesülőknél. Amini-Shirazi *et al.* (2010) valproát kombinált kezelésben részesülő pácienseinél magasabb 4-én valproát koncentrációt tapasztalt, mint a monoterápiában részesülőknél. Betegeinknél a párhuzamos gyógyszeres kezelés fokozott expressziót okozó hatása kizárható volt, ugyanis a vizsgálatba csak valproát monoterápiában részesülő gyermekeket vontunk be. Az alacsony expresszálók szokatlanul magas aránya valamilyen szuppresszív hatást jelezhet. Logikus magyarázat lehet a gyulladáskeltő citokinek felszabadulása az epilepsziás rohamokat követően. A citokintermelés hatással van a máj fehérjeszintézisére is, a gyógyszerlebontó enzimek expressziója csökken, az akut-fázis fehérjék szintje pedig emelkedik (Uludag *et al.* 2013). A CYP2C9 aktivitás csökkenése a gyulladásos citokinek (IL-6, IL-8) hatására bekövetkező

CYP2C9 expresszió csökkenésére vezethető vissza, amely a CYP2C9 transzkripcióját szabályzó nukleáris receptorok (PXR, CAR) represszióján keresztül valósul meg (Pascussi *et al.* 2003).

A konvencionális klinikai kezeléshez képest a CYP2C9 genotípus alapú valproát terápia előnyt jelenthet ugyan epilepsziás gyerekek kezelésében, de a CYP2C9 expresszióját felülértékelhetjük, ha pusztán a genotípusból következtetünk. Ugyan a hematológiai rendellenességek, májtoxicitás és a hiperammonémia a valproát kezelés ritka mellékhatásai, de előfordul, hogy végzetesek. A valproátnak csontvelő károsító hatást is tulajdonítanak, valamint néhány metabolitjával egyetemben májkárosodást is okozhat (Nanau és Neuman 2013). Így két mutáns alléllal (CYP2C9*2/*2, CYP2C9*3/*3, vagy CYP2C9*2/*3) rendelkező gyermekeknél egyáltalán nem javasolt a valproát kezelés, míg az egy vagy két vad típusú allélt hordozóknak a valproát terápia finomítására lehet szükség. Lévén a vizsgálatokban résztvevő gyermekek életkora széles tartományban mozgott, a hormonális állapot szintén okozhatott különbségeket a CYP2C9 expresszióban. Az expresszióbeli különbségeket viszont mérni tudjuk a mRNS szintek meghatározásával és így lehetővé válik a CYP2C9 expresszióhoz történő dózis-igazítás. Konvencionális kezelés esetén a CYPtest™ csoportba tartozó betegeink közel 75 %-a félrekezelt lenne, a homozigóta mutáns CYP2C9*2/*2 genotípusú gyermek pedig rosszul tolerálná a valproátot. A konvencionális terápia rutinja szerint a valproát koncentrációt 3-4 héttel a kezelés kezdete után mérik meg, ezalatt az idő alatt azonban nincs más támpont a dozírozás helyességének megállapításához, csak a tünetek szigorú követése (Guerrini 2006). Ezért nagy körültekintés ajánlott a páciensek klinikai és biokémiai paramétereinek megfigyelésénél, különösen a dózis-beállítás ideje alatt.

A CYP2C9-status alapján beállított terápia precízebb dozírozást és a mellékhatások kialakulásának csökkenését teszi lehetővé, mely így előnyösebb a konvencionális, tünet alapú kezelésnél. A CYP2C9-status ismerete alapján előre kiválasztható a megfelelő hatóanyag és az optimális dózis, amely javítja a terápiás koncentráció elérésének esélyét, így kevesebb betegnél alakulhat ki a terápiás tartományon kívüli valproát koncentráció. A szérumban ALP aktivitások emelkedése is nagyobb eséllyel kerülhető el. A szérumban ALP aktivitás kóros megemelkedése a csont-anyagcsere zavarára és hepatotoxicitásra utalhat. Alacsonyabb csontsűrűséget és csökkent csontképződést figyeltek meg epilepsziás gyermekeknél hosszú ideig tartó (> 6

hónap) valproát kezelés esetén (Guo *et al.* 2001). Vizsgálatunkban a páciensek csak egy hónapja álltak valproát kezelés alatt, a kalcium és foszfor szintjeik is a referencia tartományokon belül voltak, ezért úgy gondoljuk, hogy a kontroll csoportnál tapasztalt emelkedett ALP szintek egyéb patomechanizmusokat jeleznek. A hiperammonémia, ami a csökkent hatékonyságú urea ciklus következménye (Aires *et al.* 2011), szintén gyakran fordult elő a kontroll csoport páciensei között, ráadásul rendkívül magas ALP szintek és valproát koncentrációk ($> 100 \mu\text{g/ml}$) kísérték. A vér ammóniaszintjének növekedése hepatotoxicitásra utal, amely encephalopathia-hoz vezethet (Sousa 2013).

Vizsgálataink során elsőként igazoltuk a CYP2C9 genetikai és nem-genetikai eltéréseinek hatását a valproát metabolizmusában. Eredményeink jelzik, hogy a személyre szabott antikonvulzáns terápia jól alkalmazható epilepsziás gyermekek CYP2C9-statusának meghatározásával. Elkerülhető a téves adagolás és megelőzhetőek a túlzott valproát vérszintek, így olyan toxikus mellékhatások kialakulása, mint az emelkedett ALP szintek és a hiperammonémia.

6.4 Következtetések

A kutatómunka során igazoltuk, hogy a három hatóanyag (klonazepam, klozapin, valproát) betegeknél mért vérszintjei és a lebontásukban részt vevő CYP enzimek expressziója között összefüggés van, melyet a személyre szabott terápia kialakításában fel lehet használni.

A klonazepam vérszintjének alakulására egyértelműen a CYP3A4 expresszió van hatással, a metabolit 7-aminoklonazepam koncentrációját pedig a CYP3A4 expresszió és a NAT2 acetiláló fenotípus együttesen alakítja ki. A CYP3A4-status meghatározásával előre jelezhető a gyenge metabolizáló képesség, így elkerülhető a magasabb klonazepam szintekkel együtt járó mellékhatások megjelenése, míg a NAT2 acetiláló fenotípus ismerete a klonazepam terápia visszavonásakor jelent fontos információt. A CYP3A4- és a NAT2-status együttes ismerete alapján beállított klonazepam dózírozás hatékonyabb terápiához vezethet, csökkenhetnek a mellékhatások, és elkerülhetők a megvonási tünetek is.

A klozapin-metabolizáló enzimek expressziójának ismerete hasznos lehet a klozapin céldózisának beállításánál és így a vérszintek alakulásában. Habár eredményeink további megerősítése nagyobb betegszámon szükséges lenne, a

CYP3A-status döntő szerepét a klozapin vérszint kialakulásában egyértelműen bizonyítottuk, egy alapvetően alacsony CYP1A2 expresszióval rendelkező betegpopuláció esetén. Átlagos/magas CYP3A4 expresszióval vagy *CYP3A5*1* alléllal rendelkező betegek körülbelül kétszer akkora napi dózist igényelnek a terápiás koncentráció eléréséhez, mint a CYP3A4-et alacsonyan expresszáló társaik. A jelenlegi klinikai gyakorlat szerint meghatározott dózis az alacsony CYP3A4 expressziójú betegek esetén tűnik megfelelőnek. Ugyanakkor a betegek többsége a CYP3A4-et átlagosan expresszálta, akiknél a klozapin vérszint elmaradt a terápiás hatáshoz szükséges koncentrációtól.

Gyermekekben a valproát eliminációjában a CYP2C9 enzim szerepe a meghatározó. A *CYP2C9* genotípus ismerete ugyan jelent némi előnyt, de nem szűri ki a nem-genetikai hibából eredő gyenge metabolizáló képességet. CYP2C9 expressziót csökkentő hatása van például az epilepsziás rohamokat követő citokin felszabadulásnak. A CYP2C9 fenokonverzió miatt az epilepsziás gyermekek nagyobb része inkább alacsony, mint átlagos CYP2C9 expresszióval rendelkezik, így részükre csökkentett dózis szükséges a terápiás koncentráció eléréséhez. A CYP2C9-status alapú terápia alkalmazásával elkerülhető a hibás dozírozás, és a túl magas valproát koncentráció okozta toxikus mellékhatások kialakulása.

7 EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Az *in vitro* gátlásvizsgálatok során megerősítettük a CYP3A4/5 enzim szerepét a klonazepam 7-aminoklonazepammá történő átalakulásában. A klozapin lebomlásának két fontos metabolikus útja az N-oxidáció és az N-demetiláció. A klozapin N-oxid keletkezését szintén a CYP3A4/5 enzim katalizálta, a norklozapin képződésében pedig a CYP3A4/5 mellett kisebb mértékben a CYP1A2 és a CYP2D6 is részt vett.

In vivo vizsgálatainkban az irodalmi adatok alapján és az *in vitro* enzimtéreképezés során azonosított enzimek klinikai jelentőségét vizsgáltuk.

7.1 Tézispontok

- 1.1. Megállapítottuk, hogy a *CYP3A5* genotípus nem befolyásolta a kialakuló klonazepam szérumszinteket, ellenben a *CYP3A4* expresszió szoros összefüggést mutatott a normalizált klonazepam szintekkel. Az átlagos *CYP3A4* expressziójú betegek szignifikánsan alacsonyabb klonazepam vérszintekkel rendelkeztek, mint az alacsony expressziójú társaik. A 7-aminoklonazepam szérumszintjeinek alakulását pedig a NAT2 acetiláló képesség is befolyásolta. Átlagos *CYP3A4* expressziójú és lassú NAT2 acetiláló betegekben tapasztaltuk a legmagasabb 7-aminoklonazepam/klonazepam koncentráció arányt, ami a 7-amino metabolit felhalmozódására utal.
- 1.2. A normalizált klozapin koncentrációk alakulásában a *CYP2C19* és a *CYP2D6* genotípusoknak nem volt jelentősége. A *CYP1A2* nagyrészt alacsony szinten expresszálódott a vizsgált betegpopulációban. Az irodalmi adatokkal ellentétben a *CYP1A2* expresszió a klozapin vérszintek között nem találtunk összefüggést. Ugyanakkor a döntően átlagos *CYP3A4* expresszióval rendelkező betegek jelentősen alacsonyabb vérszinteket mutattak, mint a *CYP3A4*-et alacsonyan expresszálók. Valamint a működő *CYP3A5* alléllal, de alacsony *CYP3A4* expresszióval rendelkező betegek is az átlagos *CYP3A4* expressziójúakra jellemző klozapin vérszinteket mutatták. A klozapin N-oxid/klozapin és a norklozapin/klozapin koncentráció arányok szintén a *CYP3A4* expresszióval mutattak összefüggést, tovább erősítve a *CYP3A4* enzim szerepét a klozapin lebontásában.

- 1.3. Gyermekek valproát vérszintjeinek alakulásában a CYP2C9 döntő szerepét igazoltuk. A *CYP2C9* polimorf allélt nem hordozó gyermekek valproát koncentrációit a CYP2C9 expresszió befolyásolta, az átlagos expresszió hatására feleakkora vérszinteket tapasztaltunk, mint az alacsony CYP2C9 expressziónál találhatóak. Azonban egy defektus allél jelenléte a CYP2C9 expressziótól függetlenül magas normalizált valproát vérszinteket eredményezett.

Tehát a vizsgált hatóanyagok (klonazepam, klorapin, valproát) és metabolitjaik szérumban koncentrációit az anyavegyületek átalakításában résztvevő enzimek aktuális állapota határozza meg.

2. A betegek CYP-statusa és az egyes hatóanyagok vérszintje közötti összefüggést fel tudtuk használni a terápiás vérszint eléréséhez szükséges céldózis becslésére. Az alacsony CYP3A4 expresszióval rendelkező betegek átlagosan feleakkora klonazepam illetve klorapin dózist igényelnek a terápiás koncentráció eléréséhez, mint akik átlagos szinten expresszálták a CYP3A4 enzimet. Gyermekek valproát terápiájában megfelelőnek tűnik a klinikai rutinban alkalmazott 30-40 mg/ttkg céldózis, amennyiben nem hordoznak CYP2C9 polimorf allélt. Ha mindkét szülőtől hibás allélt örökölték, akkor nem javasolt a valproát terápia alkalmazása, egyéb antikonvulzív gyógyszer adása javasolt. Amennyiben egy hibás allélt hordoznak, vagy alacsony CYP2C9 expresszióval rendelkeznek, akkor csökkentett dózissal (<20 mg/ttkg) valproát kezelést igényelnek a terápiás koncentráció eléréséhez.
3. Végezetül a CYPtestTM alapú valproát terápia előnyeit vizsgáltuk a klinikai gyakorlatban jelenleg alkalmazott tüneti terápiával szemben. A CYP2C9-status alapján kezelt betegcsoportban szignifikánsan kevesebb volt a félredozirozott páciens, és így a terápiás tartományon kívül eső betegek száma, mint a konvencionális kezelésben részesülő gyermekek esetében. A valproát indukálta komoly mellékhatások (hiperammonémia és emelkedett ALP szintek) szintén kisebb mértékben jelentkeztek a CYP2C9-status alapján kezelt csoportban, ugyanakkor egyéb mellékhatásokat, mint súlygyarapodás és álmoság nem lehetett elkerülni. Eredményeink alapján a CYP-status alapú kezeléssel elkerülhető az aluldozirozásból eredő hatáselmaradás vagy a túldozirozás miatti mellékhatások megjelenése.

8 ABSZTRAKT

A betegek gyógyszer-metabolizáló képességének becslésére alapul szolgálhat a kutatócsoport korábbi megállapítása, miszerint a máj CYP enzim aktivitásai és a fehérvérsejtekben mérhető CYP mRNS expresszió között szoros összefüggés van. A máj gyógyszerlebontó enzimei közül a CYP enzimek expresszálódnak a legnagyobb mennyiségben, így némi egyszerűsítéssel megállapíthatjuk, hogy a CYP enzimek aktuális állapotának meghatározásával nagyban következtethetünk a máj gyógyszerlebontó kapacitására. A CYP enzimek a forgalomban levő gyógyszerek ~70 %-át metabolizálják, és vezető szerepet töltenek be a pszichofarmakonok lebontásában is. Így pszichiátriai és neurológiai betegek gyógyszer-metabolizáló képességének meghatározásával lehetőség nyílik a gyógyszeres kezelés racionalizálására. Az antipszichotikus illetve antiepileptikus terápiára egyaránt jellemző, hogy a hatás lassan alakul ki, az egyes gyógyszerek céldózisának beállítása és a kezelés leállítása is heteket, hónapokat vesz igénybe. A dózírozás módosítása illetve megszüntetése a mellékhatások megjelenésekor valamint hatástalanság esetén történik.

Klonazepammal illetve klorapinnal kezelt pszichiátriai betegek, valamint valproát kezelés előtt álló epilepsziás gyermekek CYP-statusát (CYP genotípus és mRNS expresszió) határoztuk meg real-time PCR technikával. A klonazepam és klorapin szérumkoncentrációinak meghatározása HPLC-MS/MS módszerrel, a valproát koncentrációk mérése pedig FPIA technikával történt. Az egyes hatóanyagok vérszintje és a betegek CYP-statusa között összefüggést találtunk, mely alkalmasnak bizonyult az optimális dózis becslésére is. A klonazepam vérszintek alakulását, és így a dózírozást a CYP3A4 enzim expressziója befolyásolta, a NAT2-status ismerete pedig a klonazepam terápia leállításakor nyújt fontos információt. Habár a klorapin eliminációjában a CYP1A2 enzimet tartják meghatározónak, alacsony CYP1A2 expresszió esetén a klorapin vérszintek alakulásában a CYP3A-status ismerete válik döntővé. Epilepsziás gyermekek valproát metabolizmusában pedig a CYP2C9-status meghatározó szerepét kell hangsúlyozni. A CYP2C9 genotípus meghatározásával egyrészt a kezelés megkezdése előtt megjósolható, hogy a tervezett antiepileptikum megfelelő-e az adott betegnek, a CYP2C9 mRNS expresszió ismeretében pedig támpontot adhatunk a céldózisra is. Epilepsziás gyermekek esetén igazoltuk is a CYP2C9-status alapú terápia előnyét a

konvencionális kezeléssel szemben. A CYP2C9-status alapján kezelt gyermekek valproát vérszintjei nagyobb eséllyel voltak a terápiás tartományon belül, és gyakorlatilag kiküszöbölhető volt a toxikus mellékhatások megjelenése is.

9 ABSTRACT

Patients' drug-metabolizing capacities can be estimated by the correlation between CYP enzyme activities in the liver and the corresponding CYP-expressions in leukocytes. CYP enzymes are the most abundant drug-metabolizing enzymes in the liver; thus, a patient's drug-metabolizing capacity can be estimated by the patient's current CYP-status (CYP genotype and CYP mRNA expression).

CYP enzymes are responsible for the biotransformation of ~70 % of the drugs in clinical use and they also have a principal role in the elimination of psychopharmacoens. Thus estimation of drug-metabolizing capacity of psychiatric and neurologic patients will allow the rationalization of psychopharmacotherapy. During antipsychotic and antiepileptic therapy, the optimal pharmacological effect slowly evolves, and withdrawal may take weeks or months. Dose modifications or therapy interruption are often required because of adverse reactions or nonresponsiveness.

The CYP-status (CYP genotype and CYP mRNA expression) were determined by qPCR in psychiatric patients treated with clonazepam or clozapine and in epileptic children before the beginning of valproate therapy. Blood levels of clonazepam and clozapine were determined by HPLC-MS/MS and valproate concentrations were assayed by the FPIA method. We found strong association between drug levels and patients' CYP-status which were found to be applicable for prediction of optimal dosing. Plasma concentrations of clonazepam was influenced by CYP3A4 expression, while NAT2 acetylator phenotype may improve the clonazepam withdrawal regimen. Although CYP1A2 is considered to be one of the major enzymes responsible for clozapine elimination, CYP3A-status could be the major determinant of clozapine concentration when patients expressed CYP1A2 at a relatively low level. Valproate metabolism in epileptic children depends on their CYP2C9-status. The knowledge of patients' CYP2C9-status before the beginning of anticonvulsant therapy guided the selection of the appropriate drug and the optimal dose. We confirmed the benefits of the CYP2C9-status guided therapy against conventional therapy in epileptic children. CYP2C9-status guided valproate treatment could prevent patients from exaggerated serum concentrations and from the apperance of toxic symptoms (hyperammonaemia, elevated alkaline phosphatase level).

10 KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném végtelenül hálásan megköszönni témavezetőm, Dr. Monostory Katalin segítő munkáját, hasznos tanácsait és soha nem szűnő optimizmusát.

A szerkezeti biokémia program jelenlegi és volt vezetőjének Dr. Kovács Mihálynak és Dr. Nyitrai Lászlónak, hogy lehetőséget biztosítottak a programban a kutatás elvégzésére.

Köszönettel tartozom Sirok Dávidnak a HPLC-MS/MS mérések lelkiismeretes elvégzéséért és Ales Belic-nek az eredmények bioinformatikai elemzésében és a modellezésben nyújtott segítségéért.

Köszönöm a konstruktív eszmecseréket és a jó hangulatot a Metabolikus Gyógyszer-kölcsönhatások csoport minden tagjának, különösen Kiss Ádámnak és Déri Máténak.

Köszönöm továbbá professzor Bitter Istvánnak, Dr. Csukly Gábornak, és Dr. Nagy Andreának hogy mindvégig bizalommal fordulhattam hozzájuk szakmai segítségért. A mintavételekért és a pontos adminisztrációért Szabó Máriának tartozom köszönettel.

Kedvesemnek, Dr. Radnai Lászlónak, hogy nem hagyott békén, és folyamatosan bíztatott, számonkért és szeretett.

És végül, de nem utolsósorban köszönöm a családomnak és a barátaimnak a folyamatos támogatást.

11IRODALOMJEGYZÉK

Adehin A, Bolaji OO, Maggo S, *et al.* (2017) "Relationship between metabolic phenotypes and genotypes of CYP1A2 and CYP2A6 in the Nigerian population." *Drug Metabolism and Personalized Therapy* 32(1): 39-47.

Aires CC, van Cruchten A, Ijlst L, *et al.* (2011) "New insights on the mechanisms of valproate-induced hyperammonemia: inhibition of hepatic N-acetylglutamate synthase activity by valproyl-CoA." *Journal of Hepatology* 55(2): 426-434.

Aklillu E, Carrillo JA, Makonnen E, *et al.* (2003) "Genetic polymorphism of CYP1A2 in Ethiopians affecting induction and expression: characterization of novel haplotypes with single-nucleotide polymorphisms in intron 1." *Molecular Pharmacology* 64(3): 659-669.

Allorge D, Chevalier D, Lo-Guidice JM, *et al.* (2003) "Identification of a novel splice-site mutation in the CYP1A2 gene." *British Journal of Clinical Pharmacology* 56(3): 341-344.

Amini-Shirazi N, Ghahremani MH, Ahmadkhaniha R, *et al.* (2010) "Influence of CYP2C9 polymorphism on metabolism of valproate and its hepatotoxin metabolite in Iranian patients." *Toxicology Mechanisms and Methods* 20(8): 452-457.

Amirimani B, Ning B, Deitz AC, *et al.* (2003) "Increased transcriptional activity of the CYP3A4*1B promoter variant." *Environmental and Molecular Mutagenesis* 42(4): 299-305.

Arranz MJ, Dawson E, Shaikh S, *et al.* (1995) "Cytochrome P4502D6 genotype does not determine response to clozapine." *British Journal of Clinical Pharmacology* 39(4): 417-420.

Ayano G (2016) "Schizophrenia: A Concise Overview of Etiology, Epidemiology Diagnosis and Management: Review of literatures." *Journal of Schizophrenia Research* 3(2): 1026.

Azorin JM, Kaladjian A and Fakra E (2005) "Current issues on schizoaffective disorder." *L'Encephale* 31(3): 359-365.

Boukouvala S and Sim E (2005) "Structural analysis of the genes for human arylamine N-acetyltransferases and characterisation of alternative transcripts." *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 96(5): 343-351.

Brodie MJ, Mintzer S, Pack AM, *et al.* (2013) "Enzyme induction with antiepileptic drugs: cause for concern?" *Epilepsia* 54(1): 11-27.

Chetty M and Murray M (2007) "CYP-Mediated Clozapine Interactions: How Predictable Are They?" *Current Drug Metabolism* 8(4): 307-313.

Chouinard G (2004) "Issues in the clinical use of benzodiazepines: Potency, withdrawal, and rebound." *Journal of Clinical Psychiatry* 65: 7-12.

Cohen LG, Chesley S, Eugenio L, *et al.* (1996) "Erythromycin-induced clozapine toxic reaction." *Archives of Internal Medicine* 156(6): 675-677.

Coleman MD (2010). "Cytochrome P450 Inhibition". *Human Drug Metabolism*, John Wiley & Sons, Ltd 10.1002/9780470689332.ch5: 93-123.

Collins PY, Patel V, Joestl SS, *et al.* (2011) "Grand challenges in global mental health." *Nature* 475(7354): 27-30.

Cresteil T (1998) "Onset of xenobiotic metabolism in children: toxicological implications." *Food Additives & Contaminants* 15 Suppl: 45-51.

Czekaj P and Skowronek R (2012). "Transcription Factors Potentially Involved in Regulation of Cytochrome P450 Gene Expression". *Topics on Drug Metabolism*. Paxton J, InTech 10.5772/27817.

Dahl ML, Llerena A, Bondesson U, *et al.* (1994) "Disposition of clozapine in man: lack of association with debrisoquine and S-mephenytoin hydroxylation polymorphisms." *British Journal of Clinical Pharmacology* 37(1): 71-74.

Daly AK (2006) "Significance of the minor cytochrome P450 3A isoforms." *Clinical Pharmacokinetics* 45(1): 13-31.

David Josephy P, Peter Guengerich F and Miners JO (2005) ""Phase I and Phase II" drug metabolism: terminology that we should phase out?" *Drug Metabolism Reviews* 37(4): 575-580.

de Leon J and Diaz FJ (2005) "A meta-analysis of worldwide studies demonstrates an association between schizophrenia and tobacco smoking behaviors." *Schizophrenia Research* 76(2-3): 135-157.

Dean L (2016). "Clozapine therapy and CYP2D6, CYP1A2, and CYP3A4 genotypes". *Medical Genetics Summaries*. Pratt V, McLeod H, Dean L and Malheiro A, Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US).

Deckers CL, Czuczwar SJ, Hekster YA, *et al.* (2000) "Selection of antiepileptic drug polytherapy based on mechanisms of action: the evidence reviewed." *Epilepsia* 41(11): 1364-1374.

Desta Z, Zhao X, Shin JG, *et al.* (2002) "Clinical significance of the cytochrome P450 2C19 genetic polymorphism." *Clinical Pharmacokinetics* 41(12): 913-958.

Doring B and Petzinger E (2014) "Phase 0 and phase III transport in various organs: combined concept of phases in xenobiotic transport and metabolism." *Drug Metabolism Reviews* 46(3): 261-282.

Eiermann B, Engel G, Johansson I, *et al.* (1997) "The involvement of CYP1A2 and CYP3A4 in the metabolism of clozapine." *British Journal of Clinical Pharmacology* 44(5): 439-446.

EMMI (2016). Az Emberi Erőforrások Minisztériuma szakmai irányelve a bipoláris affektív betegségek diagnosztikájáról és terápiájáról. Egészségügyi Közlöny, EMMI. **LXV. évfolyam.**

EMMI (2017). Az Emberi Erőforrások Minisztériuma szakmai irányelve az epilepsziás rohamok és epilepszia felismeréséről, kezeléséről és az epilepsziás betegek gondozásáról. Egészségügyi Közlöny, EMMI. **LXVI. évfolyam.**

Eschenhof E (1973) "[Studies on the disposition of the anticonvulsant clonazepam in the organisms of rat, dog, and man]." *Arzneimittel-Forschung* 23(3): 390-400.

Fang J, Coutts RT, McKenna KF, *et al.* (1998) "Elucidation of individual cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of clozapine." *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 358(5): 592-599.

Fekete S, Herold R, Tényi T, *et al.* (2010) "Skizofrénia szakmai protokoll." *Pszichiátriai útmutató.*

Ferrari M, Bolla E, Bortolaso P, *et al.* (2012) "Association between CYP1A2 polymorphisms and clozapine-induced adverse reactions in patients with schizophrenia." *Psychiatry Research* 200(2-3): 1014-1017.

Fromenty B and Pessayre D (1995) "Inhibition of Mitochondrial Beta-Oxidation as a Mechanism of Hepatotoxicity." *Pharmacology & Therapeutics* 67(1): 101-154.

Garcia-Martin E, Martinez C, Pizarro RM, *et al.* (2002) "CYP3A4 variant alleles in white individuals with low CYP3A4 enzyme activity." *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 71(3): 196-204.

Gazdag G, Tolna J and Bitter I (2012) "Antipszichotikumok kombinációjának használata szkizofrénia kezelésében. Irodalmi áttekintés." *Neuropsychopharmacologia Hungarica* 14(3): 189-195.

Ghassabian S, Chetty M, Tattam BN, *et al.* (2010) "The participation of cytochrome P450 3A4 in clozapine biotransformation is detected in people with schizophrenia by high-throughput in vivo phenotyping." *Journal of Clinical Psychopharmacology* 30(5): 629-631.

Ghotbi R, Christensen M, Roh HK, *et al.* (2007) "Comparisons of CYP1A2 genetic polymorphisms, enzyme activity and the genotype-phenotype relationship in Swedes and Koreans." *European Journal of Clinical Pharmacology* 63(6): 537-546.

Ginsberg G, Hattis D, Sonawane B, *et al.* (2002) "Evaluation of child/adult pharmacokinetic differences from a database derived from the therapeutic drug literature." *Toxicological Sciences* 66(2): 185-200.

Gonzalez FJ (2008) "Regulation of hepatocyte nuclear factor 4 alpha-mediated transcription." *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 23(1): 2-7.

Grant DM, Blum M, Beer M, *et al.* (1991) "Monomorphic and polymorphic human arylamine N-acetyltransferases: a comparison of liver isozymes and expressed products of two cloned genes." *Molecular Pharmacology* 39(2): 184-191.

Griese EU, Zanger UM, Brudermanns U, *et al.* (1998) "Assessment of the predictive power of genotypes for the in-vivo catalytic function of CYP2D6 in a German population." *Pharmacogenetics* 8(1): 15-26.

Gronemeyer H, Gustafsson JA and Laudet V (2004) "Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily." *Nature Reviews Drug Discovery* 3(11): 950-964.

Guerrini R (2006) "Valproate as a mainstay of therapy for pediatric epilepsy." *Pediatric Drugs* 8(2): 113-129.

Guo CY, Ronen GM and Atkinson SA (2001) "Long-term valproate and lamotrigine treatment may be a marker for reduced growth and bone mass in children with epilepsy." *Epilepsia* 42(9): 1141-1147.

Gupta VH, Amarapurkar DN, Singh M, *et al.* (2013) "Association of N-acetyltransferase 2 and cytochrome P450 2E1 gene polymorphisms with antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in Western India." *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 28(8): 1368-1374.

Haddad PM and Sharma SG (2007) "Adverse effects of atypical antipsychotics : differential risk and clinical implications." *CNS Drugs* 21(11): 911-936.

Haring C, Meise U, Humpel C, *et al.* (1989) "Dose-related plasma levels of clozapine: influence of smoking behaviour, sex and age." *Psychopharmacology (Berl)* 99 Suppl(40): S38-40.

Hein DW and Doll MA (2012) "Accuracy of various human NAT2 SNP genotyping panels to infer rapid, intermediate and slow acetylator phenotypes." *Pharmacogenomics* 13(1): 31-41.

Hein DW, Doll MA, Fretland AJ, *et al.* (2000) "Molecular Genetics and Epidemiology of the *NAT1* and *NAT2* Acetylation Polymorphisms." *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 9(1): 29-42.

Herings RMC, Stricker BHC, Deboer A, *et al.* (1995) "Benzodiazepines and the Risk of Falling Leading to Femur Fractures - Dosage More Important Than Elimination Half-Life." *Archives of Internal Medicine* 155(16): 1801-1807.

Hickman D, Risch A, Buckle V, *et al.* (1994) "Chromosomal localization of human genes for arylamine N-acetyltransferase." *Biochemical Journal* 297 (Pt 3): 441-445.

Hiemke C, Baumann P, Bergemann N, *et al.* (2011) "AGNP Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Psychiatry: Update 2011." *Pharmacopsychiatry* 44(6): 195-235.

Hines RN (2008) "The ontogeny of drug metabolism enzymes and implications for adverse drug events." *Pharmacology & Therapeutics* 118(2): 250-267.

Honkakoski P and Negishi M (2000) "Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors." *Biochemical Journal* 347(Pt 2): 321-337.

Ingelman-Sundberg M (2001) "Pharmacogenetics: an opportunity for a safer and more efficient pharmacotherapy." *Journal of Internal Medicine* 250(3): 186-200.

Jancova P, Anzenbacher P and Anzenbacherova E (2010) "Phase II drug metabolizing enzymes." *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 154(2): 103-116.

Jaquenoud Sirot E, Knezevic B, Morena GP, *et al.* (2009) "ABCB1 and cytochrome P450 polymorphisms: clinical pharmacogenetics of clozapine." *Journal of Clinical Psychopharmacology* 29(4): 319-326.

Jenner P, Pratt JA and Marsden CD (1986) "Mechanism of action of clonazepam in myoclonus in relation to effects on GABA and 5-HT." *Advances in Neurology* 43: 629-643.

Jiang ZW, Dragin N, Jorge-Nebert LF, *et al.* (2006) "Search for an association between the human CYP1A2 genotype and CYP1A2 metabolic phenotype." *Pharmacogenetics and Genomics* 16(5): 359-367.

Johannessen CU and Johannessen SI (2003) "Valproate: past, present, and future." *CNS Drug Reviews* 9(2): 199-216.

Jover R, Moya M and Gomez-Lechon MJ (2009) "Transcriptional regulation of cytochrome p450 genes by the nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4- α ." *Current Drug Metabolism* 10(5): 508-519.

Kashuba ADM, Nafziger AN, Kearns GL, *et al.* (1998) "Effect of fluvoxamine therapy on the activities of CYP1A2, CYP2D6, and CYP3A as determined by phenotyping." *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 64(3): 257-268.

Kiang TK, Ho PC, Anari MR, *et al.* (2006) "Contribution of CYP2C9, CYP2A6, and CYP2B6 to valproic acid metabolism in hepatic microsomes from individuals with the CYP2C9*1/*1 genotype." *Toxicological Sciences* 94(2): 261-271.

Kovács G (2011) "A szkizofrénia gyógyszeres kezelése." *Neuropsychopharmacologia Hungarica* 13(4): 239-247.

Lameh J, Burstein ES, Taylor E, *et al.* (2007) "Pharmacology of N-desmethyloclozapine." *Pharmacology & Therapeutics* 115(2): 223-231.

Landi S, Gemignani F, Moreno V, *et al.* (2005) "A comprehensive analysis of phase I and phase II metabolism gene polymorphisms and risk of colorectal cancer." *Pharmacogenetics and Genomics* 15(8): 535-546.

Lazáry J, Eleméry M, Csala I, *et al.* (2016) "Egyénre szabott terápia: a gyógyszeripar rémálma?" *Neuropsychopharmacologia Hungarica* 18(3): 137-142.

Lee CR, Goldstein JA and Pieper JA (2002) "Cytochrome P450 2C9 polymorphisms: a comprehensive review of the in-vitro and human data." *Pharmacogenetics* 12(3): 251-263.

Legare N, Gregoire CA, De Benedictis L, *et al.* (2013) "Increasing the clozapine: norclozapine ratio with co-administration of fluvoxamine to enhance efficacy and minimize side effects of clozapine therapy." *Medical Hypotheses* 80(6): 689-691.

Linnet K and Olesen OV (1997) "Metabolism of clozapine by cDNA-expressed human cytochrome P450 enzymes." *Drug Metabolism & Disposition* 25(12): 1379-1382.

Lu H and Rosenbaum S (2014) "Developmental pharmacokinetics in pediatric populations." *The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics* 19(4): 262-276.

Lu ML, Lane HY, Lin SK, *et al.* (2004) "Adjunctive fluvoxamine inhibits clozapine-related weight gain and metabolic disturbances." *Journal of Clinical Psychiatry* 65(6): 766-771.

Mendonca Junior FJ, Scotti L, Ishiki H, *et al.* (2015) "Benzo- and thienobenzo-diazepines: multi-target drugs for CNS disorders." *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 15(8): 630-647.

Mendoza MC and Lindenmayer JP (2009) "N-desmethylozapine: is there evidence for its antipsychotic potential?" *Clinical Neuropsychopharmacology* 32(3): 154-157.

Monostory K, Toth K, Kiss A, *et al.* (2015) "Personalizing initial calcineurin inhibitor dosing by adjusting to donor CYP3A-status in liver transplant patients." *British Journal of Clinical Pharmacology* 80(6): 1429-1437.

Morselli PL and Franco-Morselli R (1980) "Clinical pharmacokinetics of antiepileptic drugs in adults." *Pharmacology & Therapeutics* 10(1): 65-101.

Munakata M and Tsuchiya S (2008) "Residual effect of a 7-amino metabolite of clonazepam on GABAA receptor function in the nucleus reticularis thalami of the rat." *Epilepsia* 49(10): 1803-1808.

Nakajima M, Yokoi T, Mizutani M, *et al.* (1999) "Genetic polymorphism in the 5'-flanking region of human CYP1A2 gene: effect on the CYP1A2 inducibility in humans." *The Journal of Biochemistry* 125(4): 803-808.

Nanau RM and Neuman MG (2013) "Adverse drug reactions induced by valproic acid." *Clinical Biochemistry* 46(15): 1323-1338.

Nardi AE, Freire RC, Valenca AM, *et al.* (2010) "Tapering Clonazepam in Patients With Panic Disorder After at Least 3 Years of Treatment." *Journal of Clinical Psychopharmacology* 30(3): 290-293.

Nebert DW and Dalton TP (2006) "The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis." *Nature Reviews Cancer* 6(12): 947-960.

Nebert DW and Russell DW (2002) "Clinical importance of the cytochromes P450." *Lancet* 360(9340): 1155-1162.

Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, *et al.* (1996) "P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature." *Pharmacogenetics* 6(1): 1-42.

Ng W, Kennar R and Uetrecht J (2014) "Effect of clozapine and olanzapine on neutrophil kinetics: implications for drug-induced agranulocytosis." *Chemical Research in Toxicology* 27(7): 1104-1108.

Okubo M, Murayama N, Shimizu M, *et al.* (2013) "CYP3A4 intron 6 C>T polymorphism (CYP3A4*22) is associated with reduced CYP3A4 protein level and function in human liver microsomes." *The Journal of Toxicological Sciences* 38(3): 349-354.

Olesen OV and Linnet K (2001) "Contributions of five human cytochrome P450 isoforms to the N-demethylation of clozapine in vitro at low and high concentrations." *Journal of Clinical Pharmacology* 41(8): 823-832.

Paine MF, Hart HL, Ludington SS, *et al.* (2006) "The human intestinal cytochrome P450 "pie"." *Drug Metabolism & Disposition* 34(5): 880-886.

Pariente A, Dartigues JF, Benichou J, *et al.* (2008) "Benzodiazepines and injurious falls in community dwelling elders." *Drugs & Aging* 25(1): 61-70.

Parker C (2016) "Prescribing clozapine and rifampicin: clinical impact of their interaction." *BJPsych Bulletin* 40(3): 153-155.

Pascussi JM, Dvorak Z, Gerbal-Chaloin S, *et al.* (2003) "Pathophysiological factors affecting CAR gene expression." *Drug Metabolism Reviews* 35(4): 255-268.

Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Duret C, *et al.* (2008) "The tangle of nuclear receptors that controls xenobiotic metabolism and transport: crosstalk and consequences." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 48: 1-32.

Perala J, Suvisaari J, Saarni SI, *et al.* (2007) "Lifetime prevalence of psychotic and bipolar I disorders in a general population." *Archives of General Psychiatry* 64(1): 19-28.

Peterson JA and Prough RA (1986). "Cytochrome P-450 Reductase and Cytochrome b5 in Cytochrome P-450 Catalysis". *Cytochrome P-450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. de Montellano PRO. Boston, MA, Springer US 10.1007/978-1-4757-9939-2_4: 89-117.

Polcwiartek C and Nielsen J (2016) "The clinical potentials of adjunctive fluvoxamine to clozapine treatment: a systematic review." *Psychopharmacology (Berl)* 233(5): 741-750.

Ragia G, Dahl ML and Manolopoulos VG (2016) "Influence of CYP3A5 polymorphism on the pharmacokinetics of psychiatric drugs." *Current Drug Metabolism* 17(3): 227-236.

Ray WA, Thapa PB and Gideon P (2000) "Benzodiazepines and the risk of falls in nursing home residents." *Journal of the American Geriatrics Society* 48(6): 682-685.

Riss J, Cloyd J, Gates J, *et al.* (2008) "Benzodiazepines in epilepsy: pharmacology and pharmacokinetics." *Acta Neurologica Scandinavica* 118(2): 69-86.

Sachse C, Brockmoller J, Bauer S, *et al.* (1997) "Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences." *American Journal of Human Genetics* 60(2): 284-295.

Sachse C, Brockmoller J, Bauer S, *et al.* (1999) "Functional significance of a C-->A polymorphism in intron 1 of the cytochrome P450 CYP1A2 gene tested with caffeine." *British Journal of Clinical Pharmacology* 47(4): 445-449.

Schaber G, Wiatr G, Wachsmuth H, *et al.* (2001) "Isolation and identification of clozapine metabolites in patient urine." *Drug Metabolism & Disposition* 29(6): 923-931.

Semiz S, Dujic T, Ostanek B, *et al.* (2011) "Analysis of CYP3A4*1B and CYP3A5*3 polymorphisms in population of Bosnia and Herzegovina." *Med Glas (Zenica)* 8(1): 84-89.

Seree EJ, Pisano PJ, Placidi M, *et al.* (1993) "Identification of the human and animal hepatic cytochromes P450 involved in clonazepam metabolism." *Fundamental & Clinical Pharmacology* 7(2): 69-75.

Shah RR and Smith RL (2015) "Addressing phenoconversion: the Achilles' heel of personalized medicine." *British Journal of Clinical Pharmacology* 79(2): 222-240.

Shakirullah S, Ali N, Khan A, *et al.* (2014) "The Prevalence, Incidence and Etiology of Epilepsy." *International Journal of Clinical and Experimental Neurology* 2(2): 29-39.

Shaw JLV, Cohen A, Konforte D, *et al.* (2014) "Validity of establishing pediatric reference intervals based on hospital patient data: A comparison of the modified Hoffmann approach to CALIPER reference intervals obtained in healthy children." *Clinical Biochemistry* 47(3): 166-172.

Siemes H, Nau H, Schultze K, *et al.* (1993) "Valproate (Vpa) Metabolites in Various Clinical Conditions of Probable Vpa-Associated Hepatotoxicity." *Epilepsia* 34(2): 332-346.

Sjo O, Hvidberg EF, Naestoft J, *et al.* (1975) "Pharmacokinetics and side-effects of clonazepam and its 7-amino-metabolite in man." *European Journal of Clinical Pharmacology* 8(3-4): 249-254.

Sousa C (2013) "Valproic acid-induced hyperammonemic encephalopathy - a potentially fatal adverse drug reaction." *SpringerPlus* 2(1): 13.

Strom CM, Goos D, Crossley B, *et al.* (2012) "Testing for variants in CYP2C19: population frequencies and testing experience in a clinical laboratory." *Genetics in Medicine* 14(1): 95-100.

Sylvestre MP, Abrahamowicz M, Capek R, *et al.* (2012) "Assessing the cumulative effects of exposure to selected benzodiazepines on the risk of fall-related injuries in the elderly." *International Psychogeriatrics* 24(4): 577-586.

Szádóczky E PZ, Vitrai J, Füredi J (2000) "A hangulat és szorongásos zavarok előfordulása a felnőtt magyar lakosság körében." *Orvosi Hetilap* 141: 17-22.

Szegedi A, Anghelescu I, Wiesner J, *et al.* (1999) "Addition of low-dose fluvoxamine to low-dose clozapine monotherapy in schizophrenia: drug monitoring and tolerability data from a prospective clinical trial." *Pharmacopsychiatry* 32(4): 148-153.

Tanaka E (1998) "In vivo age-related changes in hepatic drug-oxidizing capacity in humans." *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 23(4): 247-255.

Tang YL, Mao P, Li FM, *et al.* (2007) "Gender, age, smoking behaviour and plasma clozapine concentrations in 193 Chinese inpatients with schizophrenia." *British Journal of Clinical Pharmacology* 64(1): 49-56.

Temesvári M, Kóbori L, Paulik J, *et al.* (2012) "Estimation of drug-metabolizing capacity by cytochrome P450 genotyping and expression." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 341(1): 294-305.

Timsit YE and Negishi M (2007) "CAR and PXR: the xenobiotic-sensing receptors." *Steroids* 72(3): 231-246.

Tompkins LM and Wallace AD (2007) "Mechanisms of cytochrome P450 induction." *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 21(4): 176-181.

Toscano C, Klein K, Blievernicht J, *et al.* (2006) "Impaired expression of CYP2D6 in intermediate metabolizers carrying the *41 allele caused by the intronic SNP 2988G>A: evidence for modulation of splicing events." *Pharmacogenetics and Genomics* 16(10): 755-766.

Ueda R, Iketaki H, Nagata K, *et al.* (2006) "A common regulatory region functions bidirectionally in transcriptional activation of the human CYP1A1 and CYP1A2 genes." *Molecular Pharmacology* 69(6): 1924-1930.

Ulrich S, Baumann B, Wolf R, *et al.* (2003) "Therapeutic drug monitoring of clozapine and relapse--a retrospective study of routine clinical data." *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 41(1): 3-13.

Uludag IF, Bilgin S, Zorlu Y, *et al.* (2013) "Interleukin-6, interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist levels in epileptic seizures." *Seizure* 22(6): 457-461.

van der Weide J, Steijns LS and van Weelden MJ (2003) "The effect of smoking and cytochrome P450 CYP1A2 genetic polymorphism on clozapine clearance and dose requirement." *Pharmacogenetics* 13(3): 169-172.

Vukovic V, Ianuale C, Leoncini E, *et al.* (2016) "Lack of association between polymorphisms in the CYP1A2 gene and risk of cancer: evidence from meta-analyses." BMC Cancer 16(83): 016-2096.

Wang D, Guo Y, Wrighton SA, *et al.* (2011) "Intronic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs." Pharmacogenomics Journal 11(4): 274-286.

Weiner DM, Meltzer HY, Veinbergs I, *et al.* (2004) "The role of M1 muscarinic receptor agonism of N-desmethylozapine in the unique clinical effects of clozapine." Psychopharmacology (Berl) 177(1-2): 207-216.

Wenthur CJ and Lindsley CW (2013) "Classics in chemical neuroscience: clozapine." ACS Chemical Neuroscience 4(7): 1018-1025.

Wilke RA, Musana AK and Weber WW (2005) "Cytochrome P450 gene-based drug prescribing and factors impacting translation into routine clinical practice." Personalized Medicine 2(3): 213-224.

Williams PA, Cosme J, Ward A, *et al.* (2003) "Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin." Nature 424(6947): 464-468.

Wittchen HU, Jacobi F, Rehm J, *et al.* (2011) "The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010." European Neuropsychopharmacology 21(9): 655-679.

Yoshinari K, Ueda R, Kusano K, *et al.* (2008) "Omeprazole transactivates human CYP1A1 and CYP1A2 expression through the common regulatory region containing multiple xenobiotic-responsive elements." Biochemical Pharmacology 76(1): 139-145.

Yoshinari K, Yoda N, Toriyabe T, *et al.* (2010) "Constitutive androstane receptor transcriptionally activates human CYP1A1 and CYP1A2 genes through a common regulatory element in the 5'-flanking region." Biochemical Pharmacology 79(2): 261-269.

Yusufi B, Mukherjee S, Flanagan R, *et al.* (2007) "Prevalence and nature of side effects during clozapine maintenance treatment and the relationship with clozapine dose and plasma concentration." International Clinical Psychopharmacology 22(4): 238-243.

Zanger UM, Raimundo S and Eichelbaum M (2004) "Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry." Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 369(1): 23-37.

Zanger UM and Schwab M (2013) "Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation." *Pharmacology & Therapeutics* 138(1): 103-141.

Zhang WV, D'Esposito F, Edwards RJ, *et al.* (2008) "Interindividual variation in relative CYP1A2/3A4 phenotype influences susceptibility of clozapine oxidation to cytochrome P450-specific inhibition in human hepatic microsomes." *Drug Metabolism & Disposition* 36(12): 2547-2555.

Zhou SF, Liu JP and Lai XS (2009) "Substrate specificity, inhibitors and regulation of human cytochrome P450 2D6 and implications in drug development." *Current Medicinal Chemistry* 16(21): 2661-2805.

Zhou SF, Wang B, Yang LP, *et al.* (2010) "Structure, function, regulation and polymorphism and the clinical significance of human cytochrome P450 1A2." *Drug Metabolism Reviews* 42(2): 268-354.

Zhou SF, Zhou ZW and Huang M (2010) "Polymorphisms of human cytochrome P450 2C9 and the functional relevance." *Toxicology* 278(2): 165-188.

Zhou Y, Ingelman-Sundberg M and Lauschke VM (2017) "Worldwide distribution of cytochrome P450 alleles: A meta-analysis of population-scale sequencing projects." *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 10.1002/cpt.690: n/a-n/a.

12FÜGGELÉK

19. TÁBLÁZAT: A LEGGYAKORIBB CYP POLIMORFIZMUSOK DETEKTÁLÁSÁHOZ ALKALMAZOTT SZEKVENCIÁK

	Szekvencia 5'→3'	C_v (nM)	T_a (°C)
CYP2C9*2 F	AGC AAT GGA AAG AAA TGG AAG	200	57
CYP2C9*2 R	TAA GGT CAG TGA TAT GGA GTA GG	200	
CYP2C9*2 W	FAM-CTC TTG AAC ACG GTC CTC-BHQ1	50	
CYP2C9*2 M	CalRed610-CTC TTG AAC ACA GTC CTC-BHQ1	100	
CYP2C9*3 F	GCA AGA CAG GAG CCA CAT G	200	63
CYP2C9*3 R	AGG AGA AAC AAA CTT ACC TTG G	200	
CYP2C9*3 W	FAM-CGA GGT CCA GAG ATA CAT TGA C-BHQ1	50	
CYP2C9*3 M	CalRed610-CGA GGT CCA GAG ATA CCT TGA C-BHQ1	100	
CYP2C19*2 F	CTT AGA TAT GCA ATA ATT TTC CCA C	300	60,5
CYP2C19*2 R	GAA GCA ATC AAT AAA GTC CCG A	300	
CYP2C19*2 W	FAM-TGA TTA TTT CCC GGG AAC CCA TAA C-BHQ1	100	
CYP2C19*2 M	HEX-TGA TTA TTT CCC AGG AAC CCA TAA C-BHQ1	200	
CYP2C19*3 F	AGA TCA GCA ATT TCT TAA CTT GAT G	300	58
CYP2C19*3 R	TGT ACT TCA GGG CTT GGT C	300	
CYP2C19*3 W	FAM-ACC CCC TGG ATC CAG G-BHQ1	100	
CYP2C19*3 M	HEX-ACC CCC TGA ATC CAG G-BHQ1	200	
CYP2C19*17 F	ATGAACAGGATGAATGTGGTAT	300	58,5
CYP2C19*17 R	TCTTCTGATGCCCATCGT	300	
CYP2C19*17 W	FAM-TCT GTT CTC AAA GCA TCT CTG ATG T-BHQ1	100	
CYP2C19*17 M	HEX-TCT GTT CTC AAA GTA TCT CTG ATG T-BHQ1	200	
CYP2C19*4 F	CAA AGA GGC ACA CAC ACT TA	400	61
CYP2C19*4 R	CCA GAT TGA AAG GAG AAG CA	400	
CYP2C19*4 W	FAM-CAA GAG GAG AAG GCT TCA ATG GAT-BHQ1	200	
CYP2C19*4 M	HEX-CAA GAG GAG AAG GCT TCA GTG GAT-BHQ1	200	
CYP3A4*1B F	TCT GTA GGT GTG GCT TGT TG	300	62
CYP3A4*1B R	AAG GGT TCT GGG TTC TTA TCA G	300	
CYP3A4*1B W	HEX-TCG CCT CTC TCT TGC CCT TGT-BHQ1	200	
CYP3A4*1B M	FAM-TCG CCT CTC TCC TGC CCT TG-BHQ1	100	
CYP3A4*22 F	CAG AGG TAG GTC TAA TTC AGT TCA	400	62
CYP3A4*22 R	AGA TCA CCT TCT ATC ACA CTC C	400	
CYP3A4*22 W	FAM-ATC ACA CCC AGC GTA GGG C-BHQ1	200	
CYP3A4*22 M	HEX-ATC ACA CCC AGT GTA GGG CC-BHQ1	50	

	Szekvencia 5'→3'	C _v (nM)	Ta (°C)
CYP3A5*3 F	GAG AGT GGC ATA GGA GAT ACC	300	60,5
CYP3A5*3 R	TGT ACG ACA CAC AGC AAC C	300	
CYP3A5*3 W	FAM-TTT GTC TTT CAA TAT CTC TTC CCT GT-BHQ1	100	
CYP3A5*3 M	HEX-TTT GTC TTT CAG TAT CTC TTC CCT GT-BHQ1	200	
CYP2D6*3 F	TGG CAA GGT CCT ACG C	300	60,5
CYP2D6*3 R	TCC ATC TCT GCC AGG AAG	300	
CYP2D6*3 W	FAM-CAC AGG ATG ACC TGG GAC C-BHQ1	100	
CYP2D6*3 M	CalRed610-CAC GGA TGA CCT GGG ACC-BHQ1	100	
CYP2D6*4 F	CTT CGC CAA CCA CTC C	300	55
CYP2D6*4 R	GAT CAC GTT GCT CAC G	300	
CYP2D6*4 M	FAM-CCC CAA GAC GCC C-BHQ1	100	
CYP2D6*4 W	HEX-CCC CAG GAC GCC C-BHQ1	200	
CYP2D6*6 F	TCT CCG TGT CCA CCT TG	300	59
CYP2D6*6 R	GCG AAG GCG GC ACA	300	
CYP2D6*6 W	FAM-GCT GGA GCA GTG GGT GAC-BHQ1	100	
CYP2D6*6 M	CalRed610-GCT GGA GCA GGG GTG AC-BHQ1	100	
CYP2D6*10 F	TGA GGC AGG TAT GGG GCT A	300	63
CYP2D6*10 R	CAG GTT GCC CAG CCC	300	
CYP2D6*10 W	FAM-GCA CGC TAC CCA CCA GGC-BHQ1	200	
CYP2D6*10 M	CalRed610-GCA CGC TAC TCA CCA GGC-BHQ21	200	
CYP2D6*41 F	TGG CTG ACC TGT TCT CTG C	300	62
CYP2D6*41 R	CCT GGT CAA GCC TGT GCT	300	
CYP2D6*41 W	FAM-GCC GAG GGA GGA AGG GTA CAG-BHQ1	100	
CYP2D6*41 M	CalRed610-GCC GAG GGA GAA AGG GTA CAG-BHQ2	100	

20. TÁBLÁZAT: A NAT2 POLIMORF ALLÉLOK AZONOSÍTÁSÁHOZ HASZNÁLT SZEKVENCIÁK

	Szekvencia 5'→3'	C_v (nM)	Ta (°C)
NAT2*5 F	ACA AAT ACA GCA CTG GCA	300	58
NAT2*5 R	TCT GTC AAG CAG AAA ATG C	300	
NAT2*5 W	FAM-AGG TGA CCA TTG ACG GCA-BHQ1	200	
NAT2*5 M	CalRed610-AGG TGA CCA CTG ACG GCA-BHQ2	200	
NAT2*6 F	ATC TCC TGC CAA AGA AGA A	300	58
NAT2*6 R	CAA GGA ACA AAA TGA TGT GG	300	
NAT2*6 W	FAM-CGC TTG AAC CTC GAA CAA TT-BHQ1	200	
NAT2*6 M	CalRed610-CGC TTG AAC CTC AAA CAA TT-BHQ2	200	
NAT2*7 F	AAC TCT CAC TGA GGA AGA GGT TGA A	300	62
NAT2*7 R	TGG GTG ATA CAT ACA CAA GGG TTT AT	300	
NAT2*7 W	FAM-CCA AAC CTG GTG ATG GAT CCC TTA CTA TT-BHQ1	100	
NAT2*7 M	HEX-CCC AAA CCT GGT GAT GAA TCC CTT ACT AT-BHQ1	100	
NAT2*14 F	GTG GGC AAG CCA TGG AGT T	300	62
NAT2*14 R	GTG GTC AGA GCC CAG TAC AGA AG	300	
NAT2*14 W	FAM-ACC ACC CAC CCC GGT TTC TTC T-BHQ1	100	
NAT2*14 M	HEX-ACA CCA CCC ACC CTG GTT TCT TCT TA-BHQ1	100	

21. TÁBLÁZAT: A MRNS SZINT MEGHATÁROZÁSOKHOZ HASZNÁLT PRIMER ÉS PRÓBA SZEKVENCIÁK

	Szekvenciák 5'→3'	C_v (nM)
GAPDH F	AGC CAC ATC GCT CAG ACA C	200
GAPDH R	GCC CAA TAC GAC CAA ATC C	200
GAPDH P	FAM-TGG GGA AGG TGA AGG TCG-BHQ ₁	150
1A2 v2 F	GTC AAT GAC ATC TTT GGA GCA G	200
1A2 v2 R	CCT GCC AAT CAC AGT GTC C	200
1A2 v2 P	HEX-TGA CAC AGT CAC CAC AGC CAT CTC C-BHQ ₁	100
3A4 v2 F	CCC ACA CCT CTG CCT T	200
3A4 v2 R	GAT CAT GTC AGG ATC TGT GAT	300
3A4 v1 P	HEX-AGT ATG GAA AAG TGT GGG GCT T-BHQ ₁	200
2C9 v3 F	AGA TAG GTA TTA AGG ACA TCA GC	200
2C9 v3 R	CCA CTA TGG GTT TCA GGC	300
2C9 v3 P	HEX-ACC AAT CTC TCA AAG GTC TAT GGC-BHQ ₁	200
2C19 v2 F	ATC AGG ATT GTA AGC ACC C	400
2C19 v2 R	TTC TCC AAA ATA TCA CTT TCC AT	400
2C19 v2 P	HEX-CCA CTA TCA TTG ATT ATT TCC CGG-BHQ ₁	200

ADATLAP

a doktori értekezés nyilvánosságra hozatalához*

I. A doktori értekezés adatai

A szerző neve: **Tóth Katalin**

MTMT-azonosító: 10027668

A doktori értekezés címe és alcíme: **A gyógyszer-metabolizáló képességhez igazított pszichofarmakoterápia lehetőségei**

DOI-azonosító46: 10.15476/ELTE.2017.111

A doktori iskola neve: ELTE TTK Biológia Doktori Iskola

A doktori iskolán belüli doktori program neve: Szerkezeti Biokémia Program

A témavezető neve és tudományos fokozata: Dr. Monostory Katalin (PhD)

A témavezető munkahelye: MTA TTK, Enzimológiai Intézet, Metabolikus Gyógyszer-kölcsönhatások Kutatócsoport

II. Nyilatkozatok

1. A doktori értekezés szerzőjeként

a) hozzájárulok, hogy a doktori fokozat megszerzését követően a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban. Felhatalmazom a Természettudományi kar Dékáni Hivatal Doktori, Habilitációs és Nemzetközi Ügyek Csoportjának ügyintézőjét, hogy az értekezést és a téziseket feltöltse az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba, és ennek során kitöltse a feltöltéshez szükséges nyilatkozatokat.

b) kérem, hogy a mellékelt kérelemben részletezett szabadalmi, illetőleg oltalmi bejelentés közzétételéig a doktori értekezést ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;

c) kérem, hogy a nemzetbiztonsági okból minősített adatot tartalmazó doktori értekezést a minősítés (dátum)-ig tartó időtartama alatt ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;

d) kérem, hogy a mű kiadására vonatkozó mellékelt kiadó szerződésre tekintettel a doktori értekezést a könyv megjelenéséig ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban, és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban csak a könyv bibliográfiai adatait tegyék közzé. Ha a könyv a fokozatszerzést követően egy évig nem jelenik meg, hozzájárulok, hogy a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban.

2. A doktori értekezés szerzőjeként kijelentem, hogy

a) az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba feltöltendő doktori értekezés és a tézisek saját eredeti, önálló szellemi munkám és legjobb tudomásom szerint nem sértem vele senki szerzői jogait;

b) a doktori értekezés és a tézisek nyomtatott változatai és az elektronikus adathordozón benyújtott tartalmak (szöveg és ábrák) mindenben megegyeznek.

3. A doktori értekezés szerzőjeként hozzájárulok a doktori értekezés és a tézisek szövegének plágiumkereső adatbázisba helyezéséhez és plágiumellenőrző vizsgálatok lefuttatásához.

Kelt: 2017. 06. 27.



a doktori értekezés szerzőjének aláírása

*ELTE SZMSZ SZMR 12. sz. melléklet